

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

THESE 693

ANNÉE 1935

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Antoine BONNEFOI

Né le 14 Août 1908 à Pons (Charente-Inférieure)

Interne de l'Hôpital de l'Institut Pasteur

**Recherches sur l'activité antigénique
des Protéides des Bacilles tuberculeux**

(Travail du Laboratoire du Docteur Machebœuf,
de l'Institut Pasteur)

PRÉSIDENT : M. Robert DEBRÉ, Professeur

J. PEYRONNET & Cie, ÉDITEURS

7, Rue de Valois, PARIS-1^{er}

1935

THESE

ANNÉE 1935

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Antoine BONNEFOI

Né le 14 Août 1908 à Pons (Charente-Inférieure)

Interne de l'Hôpital de l'Institut Pasteur

Recherches sur l'activité antigénique des Protéides des Bacilles tuberculeux

(Travail du Laboratoire du Docteur Machebœuf,
de l'Institut Pasteur)

PRÉSIDENT : M. Robert DEBRÉ, Professeur

J. PEYRONNET & Cie, ÉDITEURS

7, Rue de Valois, PARIS-1^{er}

1935

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	ROUVIÈRE.
Physiologie	Léon BINET.
Physique médicale	STROHL.
Chimie médicale	DESGREZ.
Bactériologie	Robert DEBRÉ.
Parasitologie et histoire naturelle médicale	BRUMPT.
Pathologie médicale et générale	BAUDOUIN.
Pathologie chirurgicale	CHEVASSU.
Anatomie pathologique	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale	TIFFENEAU.
Thérapeutique	HARVIER.
Hygiène et médecine préventive	TANON.
Histoire de la médecine et de la chirurgie	BALTHAZARD.
Médecine légale	LAIGNEL-LAVASTINE.
Pathologie expérimentale et comparée	FIESSINGER.
Hydrologie thérapeutique et climatologie	Maurice VILLARET.
Clinique médicale	{ LOEPER.
	{ CARNOT.
	{ CLERC.
	{ Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses	LEMIERRE.
Clinique chirurgicale	{ CUNÉO.
	{ GOSSET.
	{ GRÉGOIRE.
	{ LENORMANT.
Clinique ophtalmologique	TERRIEN.
Clinique urologique	MARION.
Clinique d'accouchements	{ BRINDEAU.
	{ COUVELAIRE.
	{ JEANNIN.
Clinique gynécologique	PROUST.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale	RATHERY.
Clinique oto-rhino-laryngologique	LEMAITRE.
Clinique thérapeutique chirurgicale	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique	SERGENT.
Clinique de la Tuberculose	BEZANÇON.
Clinique chirurgicale orthopédique de l'adulte	MATHIEU.
	{ HOVELACQUE.
	{ MULON.
	{ OLIVIER.
Professeurs sans chaire	{ VERNE.
	{ MOCQUOT.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

BÉNARD (Henri)	Pathologie médicale.
BERNARD Etienne	Pathologie médicale.
BOULIN	Pathologie médicale.
BULLIARD	Histologie.
CATHALA	Pathologie médicale.
CHEVALLIER	Pathologie médicale.
DOGNON	Physique.
FEY	Urologie.
GALLIARD	Parasitologie.
GASTINEL	Bactériologie.
DE GAUDART D'ALLAINES	Pathologie chirurgicale.
GAYET	Physiologie.
GIROUD	Histologie.
HAGUENAU	Pathologie médicale.
HALPHEN	Oto-rhino-laryngologie.
HAZARD	Pharmacologie.
HUGUENIN	Anatomie pathologique.
JOANNON	Hygiène.
LABBÉ (Henri)	Chimie biologique.
LACOMME	Obstétrique.
LANTUÉJOUL	Obstétrique.
LAROCHE (Guy)	Pathologie médicale.
LEMAIRE	Pathologie expérimentale.
LEVEUF	Pathologie chirurgicale.
Mlle J. LÉVY	Pharmacologie.
LÉVY-VALENSI	Neurologie et Psychiatrie.
MOREAU	Pathologie médicale.
MOULONGUET	Pathologie chirurgicale.
MOUQUIN	Pathologie médicale.
OBERLING	Anatomie pathologique.
PETIT-DUTAILLIS	Pathologie chirurgicale.
PIÉDELIEVRE	Médecine légale.
PORTES	Obstétrique.
RICHET	Physiologie.
SANNIE	Chimie biologique.
SÈNÈQUE	Pathologie chirurgicale.
TROISIER	Pathologie expérimentale.
TURPIN	Pathologie médicale.
VIGNES	Obstétrique.
WILMOTH	Pathologie chirurgicale.
BESANÇON	Hydrologie.

MM.

ALGLAVE	Pathologie chirurgicale.
BUSQUET	Pharmacologie.
CHAILLEY-BERT	Physiologie.
LEROUX	Anatomie pathologique.
NEVEU-LEMAIRE	Parasitologie.
ZIMMERN	Physique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent

MM.

ABRAMI	Clinique médicale.
ALAJOUANINE	
AUBERTIN	
BRULÉ	
CHABROL	
CHIRAY	
DONZELOT	
DUVOIR	
HARVIER	
LIAN	
PASTEUR-VALLERY-RADOT	Clinique Chirurgicale.
SÉZARY	
BASSET	
BROCQ	
CADENAT	
GATELLIER	
HEITZ-BOYER	
MOURE	
QUENU	
SCHWARTZ	
VELTER	Clinique obstétricale.
ECALLE	
LE LORIER	
GUENIOT	
LEVY-SOLAL	
METZGER	

V. — CHARGÉS DE COURS

MM.

CHAILLEY-BERT, agrégé	Education physique. Radiologie clinique. Puériculture. Stomatologie.
LEDoux-LEBARD	
WEIL-HALLE	
FREY	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A MON PERE ET A MA MERE

A MES SŒURS

A TOUS LES MIENS

A MES CAMARADES D'INTERNAT
DES HOPITAUX DE POITIERS,
DE VERSAILLES
ET DE L'INSTITUT PASTEUR

A MES AMIS

À M. LE PROFESSEUR R. DEBRÉ

Professeur de bactériologie

Membre de l'Académie de Médecine

qui nous a fait le grand honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.

Hommages respectueux.

AU DOCTEUR LOUIS MARTIN

Directeur de l'Institut Pasteur

Membre de l'Académie de Médecine

Président du Conseil Supérieur d'Hygiène

Témoignage de notre profond respect et de
notre gratitude.

A MES MAITRES
DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE DE POITIERS

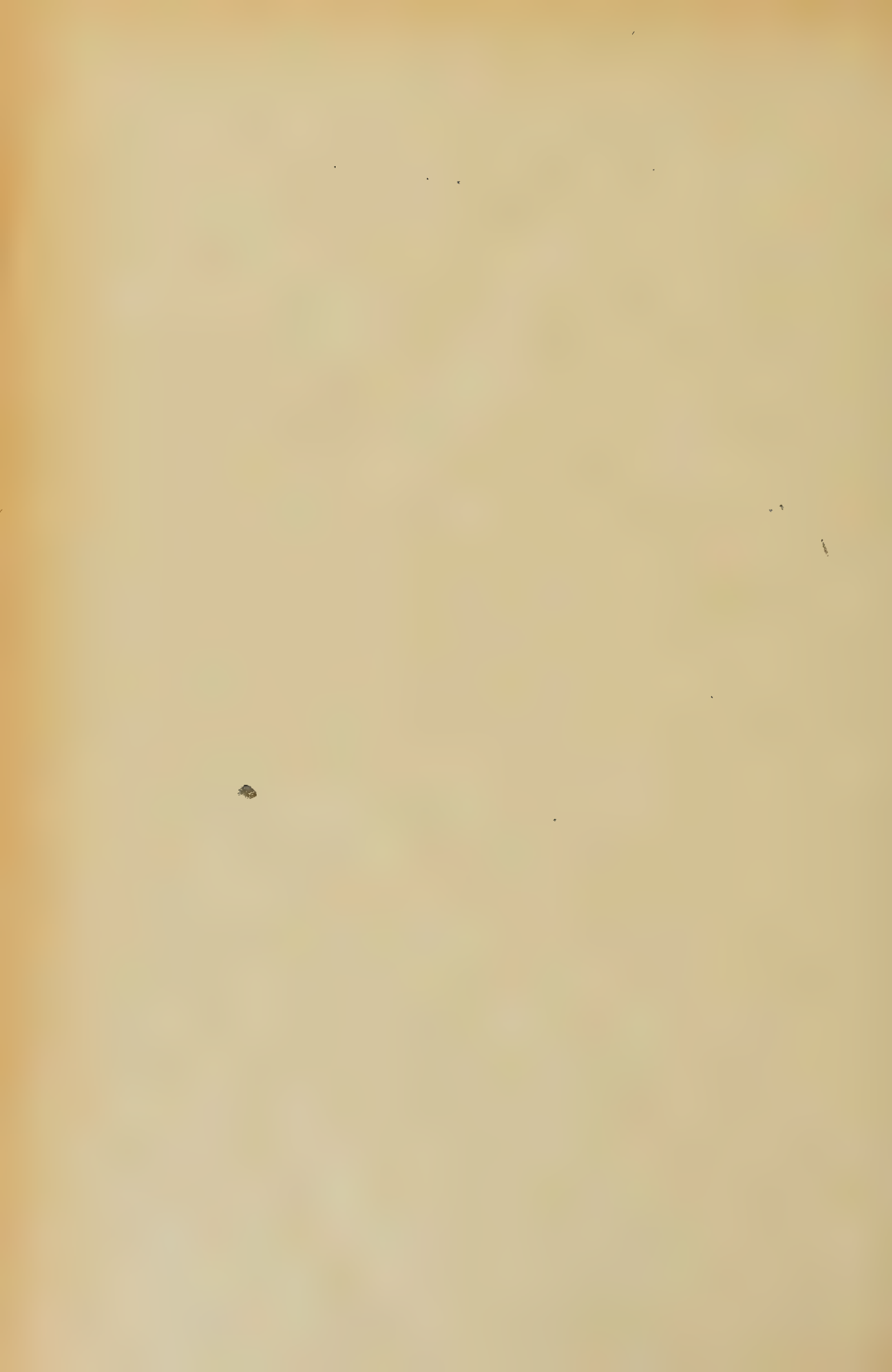
A MES MAITRES
PENDANT MON INTERNAT DE POITIERS
A MM. LES DOCTEURS AMOUROUX
(*in memoriam*)
BORRELL, LE BLAYE, PERDOUX.

A MES MAITRES
PENDANT MON INTERNAT DE VERSAILLES
A MM. LES DOCTEURS BESNARD, BRUNEL,
MAUGER, SODERLINDH.

En souvenir de leur bienveillance et de leur
enseignement.

A M. LE DOCTEUR MAURICE HEPP

pour tout l'intérêt qu'il nous a porté et les
encouragements qu'il nous a prodigués.
Nous lui adressons ici notre affectueuse
reconnaissance.



A MES MAITRES
DE LA FACULTE DES SCIENCES
DE POITIERS

A MES MAITRES
DE L'INSTITUT PASTEUR

AU DOCTEUR RENÉ MARTIN

Médecin de l'Hôpital Pasteur

qui nous a reçu dans son service, et nous a
dispensé son enseignement avec la plus
grande bienveillance. Gage de notre affec-
tueux attachement et de notre reconnais-
sance.

AU DOCTEUR M. A. MACHEBŒUF

Chef de service à l'Institut Pasteur

qui nous a accueilli dans son service et nous
a prodigué ses conseils et son enseignement.
En témoignage de notre reconnaissance.

AU DOCTEUR G. SANDOR

Assistant à l'Institut Pasteur

en souvenir de notre amitié, et de notre col-
laboration, si profitable pour nous.

INTRODUCTION

Lorsque sont connues la constitution chimique et les propriétés physiques d'une substance bien définie, il est ensuite aisé d'aborder l'étude des réactions que provoque cette substance chez les organismes vivants. Bien souvent, par contre, la succession des recherches s'effectue dans un ordre inverse et les propriétés biologiques d'un corps sont très bien étudiées avant que le moindre renseignement ne soit obtenu sur sa nature chimique, avant même que son isolement ait été tenté. Le biochimiste, le plus souvent, poursuit au milieu des innombrables constituants des organismes, le principe actif auquel peut être rapporté un phénomène biologique déterminé. Il en est ainsi pour les hormones, les vitamines, les antigènes.

Le cas fut particulièrement net pour les antigènes. On a d'abord étudié les réactions provoquées par l'introduction dans l'organisme vivant, de nombreuses matières d'origine biologique; ce n'est que plus récemment que des faits furent rapportés, éclairant la structure physico-chimique de ces substances. Les difficultés dans cet ordre de recherches sont très grandes et se rapprochent de celles rencontrées par les chercheurs qui se sont attaqués au problème de la constitution physico-chimique

des diastases. La labilité de ces substances et leur nature complexe sont les deux raisons principales de ces difficultés. Les activités biologiques disparaissent très facilement, et nos analyses chimiques n'intéressent plus que des résidus inertes. Il est cependant hors de doute que l'activité a un support chimique, et ce n'est qu'une question de temps, de travail, de méthodes appropriées, de trouver la fonction chimique qui supporte cette activité.

Dans le cas des antigènes, la tâche est particulièrement ardue. Ce sont, en effet, des substances très complexes, subissant des modifications profondes avec une grande facilité. Ces modifications s'accompagnent en particulier d'une perte de leur activité antigénique. L'analyse chimique brutale de ces corps n'est donc pas permise, puisqu'elle a pour premier effet, la perte de l'activité, et nous ignorons finalement quel était le constituant essentiel après cette dislocation de la substance primitive complexe. L'analyse physico-chimique, conduite d'une façon très ménagée, est seule possible, considérée au moins comme une première étape.

C'est avec cet esprit que nous avons entrepris l'étude de l'activité antigénique des protéides des bacilles tuberculeux. Nous avons fait subir à nos préparations des modifications relativement peu profondes et nous en avons déterminé l'influence sur l'activité antigénique.

Avant de relater nos expériences personnelles, nous allons résumer brièvement l'état actuel de nos connaissances sur la nature physico-chimique des antigènes en général.

CHAPITRE PREMIER

Activité Antigénique

Les antigènes sont des substances qui provoquent par l'introduction parentérale, chez les animaux, la formation de substances appelées anticorps. Les anticorps ne réagissent d'une façon ou d'une autre qu'avec les antigènes qui leur ont donné naissance. La manifestation la plus importante de ce jeu entre les antigènes et les organismes, est l'immunité contre les maladies infectieuses. Il est hors de doute que l'immunité est en relation avec l'effet antigénique des microbes pathogènes sur les organismes, cependant elle est d'une nature très complexe. Il faut considérer les cellules microbiennes comme des « mosaïques » d'antigènes (M. NICOLLE) (1), et l'organisme peut aussi intervenir comme un complexe d'antigènes. (Exaltation de la virulence des microbes pathogènes par passages sur l'organisme). Ainsi l'immunité est un jeu physico-chimique complexe dans lequel une série d'antigènes et une série d'anticorps correspondants interviennent avec un rythme sécrétoire par-

(1) Maurice Nicolle, *Microbiologie générale et Immunologie*, Masson, 1920.

ticulier à l'état physiologique et à la nature zoologique ou botanique des organismes considérés. Souvent certains chaînons dans le mécanisme des immunités nous échappent. La manifestation de certains antigènes pouvant ne pas être décelables par les méthodes directes, et le mécanisme dynamique complexe (rythme sécrétoire) peut nous échapper totalement. Il est non moins vrai que le problème fondamental de l'immunité est la nature exacte de l'activité antigénique.

Toute science évolue sur des bases quantitatives. Pour élucider le problème des antigènes, nous devons donc étudier tout ce qui peut être étudié d'une façon quantitative dans les réactions antigéniques. Celles-ci sont de deux grands groupes : 1° des réactions *in vivo* et, 2° des réactions *in vitro*. Les réactions *in vivo* elles-mêmes se subdivisent en deux groupes : *a*) Production des anticorps, *b*) neutralisation *in vivo* des antigènes par les anticorps déjà formés. (Effet protecteur et réaction anaphylactique). Les plus facilement accessibles sont les manifestations *in vitro* des réactions antigéniques, leurs manifestations humorales, et ce sont celles-ci qui ont donné le plus de résultats intéressants.

ANTIGÈNES PROTÉIDIQUES

Pendant longtemps, les deux fonctions principales des antigènes : production d'anticorps *in vivo*, et réaction avec les anticorps déjà formés, furent considérées comme inséparables, et confondues. La théorie d'EHR-
LICH est dominante dans toute cette première époque; d'après elle, ce sont les mêmes fonctions antigéniques

qui produisent les anticorps et réagissent avec les anticorps déjà formés. Un problème connexe concerne la nature chimique des antigènes. Pour la plupart, ce sont des protéïdes. Les auteurs admettent donc d'une part que, seuls les protéïdes naturels sont antigéniques, et, d'autre part, que l'activité antigénique in vivo et in vitro sont identiques.

Les recherches physico-chimiques sur la nature de l'activité antigénique portent plus particulièrement, à ce premier stade, sur les protéïdes naturels. Les auteurs étudient l'influence des divers facteurs sur l'activité antigénique des protéïdes.

La dénaturation des protéïdes, c'est-à-dire l'ensemble des modifications de nature peu connue, qui aboutissent à une perte ou une diminution de la solubilité ne paraît pas avoir une grande influence. En effet, dans tous les cas où la dénaturation ne s'accompagne pas d'insolubilisation totale (coagulation proprement dite), les protéïdes conservent leur activité antigénique (sinon leur spécificité); caséïne, sérum dilué ou sans électrolytes, sérum précipité par l'alcool (2), (3), (4).

Il faut interpréter dans ce sens la perte de l'activité antigénique que subissent les protéïdes coagulables lorsqu'on les soumet à l'influence de la chaleur ou de l'alcool. En effet, ces protéïdes perdent complètement leur solubilité dans ces conditions (5).

(2) Wells, *Journ. Inf. dis.* 5, 449 (1908); 6, 506 (1909); *Journ. Amer. Med. Assoc.* 50, 527 (1908); *Journ. Biol. Chem.* 28, 11 (1916).

(3) Kodama, *Zeit. f. Hyg.* 74, 30 (1913).

(4) Schanz, *Biochem. Ztschr.* 71, 406 (1915); *Pflügers. Arch.* 170-646 (1918).

(5) H. Zinsser, *Journ. of Immunol.* 9, 227 (1924), observe qu'après la coagulation par la chaleur, de l'ovalbumine ou du

Les antigènes protéidiques résistent relativement bien à l'action des acides qui aboutit cependant à leur dénaturation.

D'autres influences physico-chimiques abolissent, par contre, rapidement, l'activité antigénique des protéides. Il en est ainsi pour l'influence de certaines radiations (6) ou des alcalis (7), (8), qui aboutissent à des changements chimiques (isomérisation, racémisation), et des ferments protéolytiques qui produisent des clivages hydrolytiques.

Ces faits sont d'ailleurs souvent apportés comme de nouvelles preuves de la nature protéidique des antigènes, puisque la désintégration des protéides et la perte de leur activité antigénique paraissent être deux processus parallèles. Cependant des faits s'accumulent pour infirmer la généralité des deux propositions qui ont dominé dans la première époque de l'étude de l'activité antigénique, à savoir que seuls les protéides sont antigéniques et que l'antigène *in vivo*, et l'antigène *in vitro*, sont identiques.

ANTIGÈNES IN VIVO ET ANTIGÈNES IN VITRO.

HAPTÈNES

L'antigène *in vitro* et l'antigène *in vivo* ne sont pas toujours identiques. FORSSMANN (9) fut le premier à démontrer qu'une telle différence peut exister. En effet,

sérum, de faibles quantités de protéides restent solubles qui conservent entièrement tout au moins leur activité précipitante.

(6) Young, *Proc. Roy. Soc. Londres*, 93, 235 (1922).

(7) Dakin, *Journ. Biol. Chem.* 13, 357 (1912); 15, 263 (1913).

(8) Landsteiner et Barron, *Zeit. f. Immun.* 21, 193 (1914).

(9) Forssmann et Weil, *Biochem. Zeit.* 37, 78 (1911).

l'émulsion des reins de cobaye traités par l'alcool produit un antisérum qui ne réagit pas avec ces émulsions, mais qui fixe le complément en présence des extraits alcooliques obtenus à partir de ces mêmes organes. Ces extraits alcooliques ne sont pas eux-mêmes antigéniques. De ces expériences, il semble résulter qu'une substance différente intervient dans les réactions antigéniques in vivo et dans les réactions antigéniques in vitro. Cette conclusion, qui fut déduite par FORSSMANN (10) rend impossible la théorie d'EHRlich, mais dans ce cas, il est fort difficile de se faire une idée du mécanisme de production des antigènes. L'interprétation que nous en devons donner est tout à fait différente. La substance qui fixe le complément en présence des antisérums de FORSSMANN existe bien dans les émulsions d'organes, mais elle est masquée. En effet, si on évapore ces émulsions à sec et que l'on traite le résidu par l'alcool on obtient une solution qui fixe l'alexine. (LANDSTEINER) (11).

D'autre part, les extraits alcooliques d'organes peuvent produire les mêmes anticorps que les émulsions aqueuses. L'association des substances lipoidiques contenues dans les extraits alcooliques et de protéides naturels (sérum de porc), permet, en effet, d'obtenir des antigènes qui produisent des anticorps. LANDSTEINER (12). Les extraits aqueux contenaient donc un antigène complet dont une partie seulement existe dans les extraits alcooliques. L'antigène complet est un com-

(10) Forssmann et Fex, *Biochem. Zeit.* 61, 6 (1914).

(11) Landsteiner, *Biochem. Zeit.* 119, 294 (1921).

(12) Landsteiner et Simms, *Journ. Exp. Med.* 38, 136 (1923).

plexe entre une substance active et un support protéidique, et ce complexe seul est capable de produire des anticorps, tandis que l'antigène incomplet qui est la substance active à l'état libre, ne produit pas d'anticorps, mais réagit avec les anticorps déjà formés. LANDSTEINER appelle ces antigènes incomplets des « haptènes ». Cette explication des faits se vérifia complètement par la suite. Elle est d'ailleurs basée sur les expériences de LANDSTEINER effectuées sur les azoprotéides (13). De ces expériences, il résulte que la réactivité et la spécificité d'un antigène complexe, tel un protéide, peut ne dépendre que d'une certaine partie de cet antigène complexe.

Cette nouvelle conception d'après laquelle les antigènes cellulaires seraient constitués d'une substance antigénique active attachée à un support protéidique, a permis d'expliquer un grand nombre de faits dans des cas particuliers des antigènes microbiens. En effet, actuellement nous connaissons un grand nombre de principes microbiens qui réagissent avec les anticorps contenus dans le sérum des malades, mais qui sont incapables de provoquer la formation d'anticorps chez les sujets normaux. Les principaux représentants de ce groupe sont les antigènes lipoidiques du bacille tuberculeux MUCH (14), K. MEYER (15) et les polysides d'un grand nombre de microbes pathogènes (bacille tuberculeux, pneumocoque, streptocoque, staphylocoque, méningocoque, etc... H. ZINSSER (16); HEIDELBER-

(13) Landsteiner et Lampl, *Biochem. Zeit.* 86, 343 (1918).

(14) Mûch, *Beitr. Klin. d. Tuber* 20, 243. (1911).

(15) K. Meyer, *Zeit. f. Immunität.*, 7 (1907); 9 (1911),
14 (1912).

(16) Zinsser et Parker, *Journ. Exp. Med.* 37, 275 (1923).

GER et AVERY (17), etc... Les anticorps correspondants à ces principes ont dû être formés lors du contact entre les microorganismes et l'organisme. Il est donc logique d'admettre que ce sont des substances antigéniques actives qui, attachées au stroma protéidique des corps microbiens, constituent des antigènes complets.

ANTIGÈNES DE NATURE NON PROTÉIDIQUE

HYPERSENSIBILITÉ MÉDICAMENTEUSE

Cependant, si le plus souvent ces haptènes cellulaires ne sont pas antigéniques, leur injection à des sujets normaux provoque, dans de nombreux cas, la formation d'anticorps K. MEYER (18), BOQUET ET NÈGRE (19), NISHIMURA (20), FORD (21), ACREE ET SIMMS (22). Pour pouvoir maintenir le principe comme quoi les protéides seuls sont antigéniques, la plupart des auteurs pensent que, dans le cas où les haptènes lipoidiques ou polyosidiques sont antigéniques à eux seuls, les préparations contiennent des protéides ou des corps microbiens en faible quantité.

Mais cette explication reste hypothétique; en effet, le plus souvent, les extraits lipoidiques ou polyosidiques ne contenaient pas de protéides en quantité décelable. D'autre part, même en admettant que toutes ces

(17) Heidelberger et Avery, *Journ. Exp. Med.* 38, 73 (1923).

(18) K Meyer. *Zeit. f. Immunitä.*, 7 (1907); 9 (1911); 14 1912).

(19) Boquet et Nègre, *Ann. Inst. Pasteur*, 37 (1923).

(20) Nishimura, *Journ. Exp. Med.* 50, 419 (1929).

(21) Ford, *Journ. Inf. Dis.* 3, 19 (1906); 4, 541 (1907).

(22) Acree et Simms, *Journ. Pharmacol.* 2, 145 (1910); 4, 235 (1913).

préparations contiennent quelques corps microbiens, ou des traces de protéïdes, il reste à prouver que des traces de ceux-ci suffisent à activer le grand excès d'antigènes incomplets. En particulier, il faudrait admettre qu'un rôle en quelque sorte catalyptique revienne aux protéïdes noyés dans des micelles de substances lipoiïdiques ou polyosidiques. En face de toutes ces hypothèses, il devient au moins possible que des substances non protéïdiques peuvent aussi être antigéniques.

Pour compléter le schéma de nos connaissances sur la nature des antigènes, il faut mentionner un ensemble de faits fort curieux qui semblent prouver que des substances organiques de synthèse, relativement simples, peuvent produire elles aussi des modifications de l'organisme vivant comparables à celles dues aux antigènes naturels. Ce sont des faits bien connus d'hypersensibilité médicamenteuse, pour lesquels il s'agit en général de réactions d'hypersensibilité particulière (de type eczématoïde, localisé, ou nitritoïde, généralisé) provoquées par des substances relativement simples (diphénylamine, phénylhydrazine, salvarsan, etc...) à la suite de leur injection ou ingestion répétées. Pendant longtemps, la nature exacte de ces phénomènes fut fort discutée, et la plupart des auteurs guidés par une sorte de vitalisme obstiné, se sont refusé à les faire rentrer dans le groupe des phénomènes d'hypersensibilité véritable. Pour ces faits, comme dans des cas un peu comparables d'accoutumance médicamenteuse (arsenic, morphine) on a cherché bien d'autres explications. Cependant actuellement, il paraît bien établi que tout au moins l'application répétée de certains principes organiques sur la peau, peut provoquer la formation de réactions eczématoïdes, tout

autant que l'injection répétée d'antigènes provoque des réactions anaphylactiques : WALTHARD (23), FREI (24), BLOCH (25), NAEGLI (26), FADASSOHU (27), etc...

Ces faits, tout en restant fort épars, présentent un intérêt particulier parce qu'ils nous montrent que quelques substances chimiques synthétiques simples peuvent produire des modifications permanentes de l'organisme, se manifestant par des réactions spécifiques provoquées par ces mêmes substances. Il est ainsi possible que la prépondérance de l'activité antigénique des principes biologiques ne soit due qu'à une structure physico-chimique particulièrement apte à produire des modifications de ce genre dans l'organisme vivant.

Ainsi que nous venons de le voir, si généralement le pouvoir antigénique est l'apanage des seuls protéides, il est possible, semble-t-il, qu'il puisse être dû à des polysides ou à des substances lipoidiques. Remarquons toutefois que tous les antigènes vrais ou les haptènes, sont des colloïdes, ou tout au moins des substances n'existant dans l'eau qu'à l'état colloïdal. En effet, toutes les réactions sérologiques sont des réactions colloïdales qui nécessitent la présence de substances complexes de poids moléculaire élevé. Aucune de ces substances ne fut encore obtenue à l'état pur. Il est donc possible que certaines impuretés particulières conditionnent certaines des activités antigéniques.

(23) Walthard, *Schweiz. med. Wochenschr.* 56, 603 (1926).

(24) Frei, *Klin. Wochenschr.* 7, 1026 (1928).

(25) Bloch et Steiner-Wourlisch, *Arch. Dermat. u. Syph.* 152, 283 (1926); 162, 349 (1930).

(26) Naegeli, *Klin. Wochenschr.* 9, 924 (1930).

(27) Fadassohu, *Klin. Wochenschr.* 9, 55 (1930).

DIFFÉRENCE ENTRE L'ANTIGÈNE IN VIVO
ET L'ANTIGÈNE IN VITRO

Le problème qui nous préoccupe se pose maintenant tout seul. Quelle est la différence entre un antigène complet et un antigène incomplet, c'est-à-dire de quelles propriétés physiques ou chimiques dépend l'activité antigénique in vivo. Certains faits expérimentaux précis tendent à élucider ce problème, mais il demeure presque entièrement irrésolu.

La première hypothèse, qui fut clairement formulée par LANDSTEINER (28), admet qu'un antigène incomplet est un groupement chimique attaché à un protéide. Nous pouvons énoncer cette hypothèse comme suit : « une substance non antigénique ne peut être rendue antigénique que par une substance qui l'est elle-même ». Une série intéressante de travaux plus récents tendrait à infirmer cette hypothèse.

Ces travaux prennent leur point de départ dans les recherches de GLENNY (29) et RAMON (30) sur l'activation de l'effet antigénique par des substances irritantes et des absorbants inertes. Inspirés par ces travaux, ARMANGUÉ et GONZALEZ (31) démontrent que l'antigène hétérogénétique de FORSSMANN, qui est un haptène lipoidique, peut acquérir des propriétés antigéniques si on le fait absorber par du kaolin. Ces auteurs généralisent leurs constatations pour les haptènes lipoidiques en général. Ils trouvent que l'activation peut se faire

(28) Landsteiner. *Biochem. Zeit* 119, 294 (1921).

(29) Glenny, *Journ. Path. a Bact.* 28, 463 (1921); 29, 31 (1926); 31, 403 (1928); 34, 118, 267 (1931).

(30) Ramon, *C. R. Soc. Biol.*, 93, 506 (1925).

(31) Gonzalez et Armangué, *C. R. Soc. Biol.*, 106, 1006 (1931); 110, 216, 228 (1932).

aussi par le noir animal (32). Cependant DOERR et HALLAUER (33) avaient dit antérieurement que l'antigène hétérogénétique de FORSSMANN ne peut pas être activé par le charbon. Par contre, LANDSTEINER et JACOBS (34) confirment les travaux d'ARMANGUÉ pour l'antigène de FORSSMANN et PLAUT et RUDY (35) trouvent que les antigènes lipoïdiques du cerveau peuvent être activés par des adsorbants inertes.

Une deuxième série de travaux concerne les haptènes polyosidiques. ZOZAYA (36) trouve que les polysides du bacille de l'anthrax deviennent des antigènes vrais s'ils sont absorbés par des particules de collodion. Cet auteur étend ses travaux avec un résultat positif à un grand nombre d'autres polysides microbiens (37). Cependant divers auteurs (38), (39), n'ont pas pu confirmer les travaux de ZOZAYA ou n'obtiennent que des résultats fort irréguliers. Il semble donc qu'en tout cas l'activation des polysides par les adsorbants inertes réussit moins bien que l'activation des haptènes lipoïdiques.

Le pouvoir de provoquer la formation d'anticorps dans l'organisme vivant, le pouvoir d'immuniser, fut considéré par les premiers chercheurs comme une qualité particulière propre à certaines substances complexes d'origine biologique, en particulier aux protéïdes. Les

(32) Gonzalez et Armangué, C. R. Soc. Biol., 106, 1006 (1931); 110, 216, 228 (1932).

(33) Doerr et Hallauer, Zt. f. Immunität 47, 310 (1926).

(34) Landsteiner et Jacobs, Proc. Soc. Exp. Biol. a Med. 29, 570 (1932).

(35) Plaut et Rudy, Zt. f. Immunität, 81-87 (1933).

(36) Zozaya, Science 74, 270 (1931).

(37) J. Exp. Méd. 55, 245, 333 (1932); 51, 21 (1933).

(38) Prañz, Central. Bakt., 1 Abt. orig. 128, 381 (1933).

(39) Jacobs, J. Exp. Med. 59, 439 (1934).

travaux qui tendent à démontrer que des substances non antigéniques en elles-mêmes peuvent le devenir si on les associe à d'autres substances antigéniques, infirment cette hypothèse. Dans toutes ces recherches, il est vrai, une partie au moins des complexes antigéniques, était une substance complexe d'origine biologique, qui avait la propriété particulière de réagir avec les anticorps déjà formés. Quelques travaux toutefois, parfois contradictoires, ont tendu à démontrer que des substances qui ne sont ni antigènes, ni haptènes, peuvent acquérir dans certaines conditions ces propriétés particulières.

LANDSTEINER (40) est le premier à démontrer que les alcali-albuminates, substances entièrement dépourvues de qualités antigéniques *in vivo*, comme *in vitro*, deviennent des antigènes vrais si on les transforme en xanthoprotéides, par l'acide nitrique concentré. Ce même auteur, en collaboration avec LEVENE (41) montre que l'acide tartranilique ou le résorcinol diazotés, adsorbés par l'albumine, sensibilisent parfois le cobaye à un choc anaphylactique. Des produits de transformation des protéides naturels autres que les alcali-albuminates, pourraient aussi devenir antigéniques. Une série de travaux concerne la gélatine, elle aussi complètement dépourvue d'activité antigénique *in vivo* comme *in vitro*. ADANT (42) prétend avoir obtenu la formation d'anticorps avec la gélatine combinée au diazoanilide. HOPKINS et WORMALL (43) ne peuvent pas obtenir la for-

(40) Landsteiner et Barron, *Zt. f. Immunität* 26, 142 (1917).

(41) Landsteiner et Levene, *Journ. Exp. Med.* 52, 342 (1930).

(42) Adant, *Arch. Intern. Med. Exp.* 6, 29 (1930); *C. R. Soc. Biol.* 103, 541 (1930).

(43) Hopkins et Wormall, *Biochem. Journ.* 27, 740, 1706 (1933).

mation d'anticorps avec la gélatine copulée avec l'acide phénylisocyanique, mais cette combinaison devient dans ces conditions un haptène vis-à-vis d'un antisérum obtenu par injection d'acide phénylisocyanique copulé avec une ovalbumine. LANDSTEINER et VAN DER SCHEER (44) observent enfin que les albumoses copulées avec différents diazoïques aromatiques acquièrent une faible activité antigénique (45).

Il semble donc que l'on arrive à produire un antigène vrai en copulant deux substances non antigéniques. Cependant quelques objections graves s'opposent à cette façon de voir. Tout d'abord, les expériences d'activation des haptènes par les adsorbants inertes, donnent en général des résultats fort irréguliers. Les auteurs se contredisent, et même l'auteur qui obtient des résultats positifs peut échouer un grand nombre de fois. Pour les substances absolument inertes comme les alcali-albuminates ou la gélatine, il est toujours possible que des traces de protéïdes naturels soient demeurées dans les préparations. D'autre part, pour les haptènes, l'objection grave qui se pose est, qu'en général, ces substances sont faiblement antigéniques par elles-mêmes. Les haptènes lipoïdiques, ou tout au moins les mélanges lipoïdiques plus ou moins bien privés d'impuretés, que l'on a étudiés, produisent en général de faibles quantités d'anticorps et parfois même des quantités assez notables (en particulier les haptènes lipoïdiques du bacille tuber-

(44) Landsteiner et van der Scheer, *Zeit. f. Hyg.* 113, 1 (1932).

(45) Nous rappelons ici les résultats fort curieux d'hyper-sensibilité médicamenteuse locale qui semblent prouver que des substances chimiques simples peuvent provoquer dans l'organisme des modifications comparables, en une certaine mesure, à celles engendrées par les antigènes naturels.

culeux). Les haptènes polyosidiques des pneumocoques injectés en doses infimes à des souris, ou même administrés oralement à de jeunes rats, produisent une immunité (46-47-48).

Le seul fait bien certain qui découle de toutes ces recherches est qu'une activité constante et bien efficace des haptènes ne s'obtient que par des protéides naturels.

*
**

De très nombreux problèmes se présentent encore à l'esprit sur ces sujets. Les quelques points que nous allons étudier dans la partie expérimentale de cette thèse sont les suivants :

Les protéides des Bacilles de Koch sont antigènes. Que devient cette activité sous les diverses influences physiques ou chimiques que subissent ces protéïdes au cours de leur extraction, de leur séparation, puis de leur purification et de leur conservation? Nous avons effectué les mêmes essais sur les protéïdes extraits du milieu de culture séparé des bacilles, et même, comme l'étude, dans ce cas, est facilitée par le fait que les protéïdes sont à l'état de solution aqueuse, nous avons commencé par cette partie du travail.

Nous avons ensuite comparé l'activité des protéïdes du milieu de culture à celle des protéïdes contenus dans les bacilles. Nous avons enfin étudié le rôle propre des polyosides qui accompagnent les protéïdes dans nos extraits bacillaires comme dans le milieu de culture.

(46) Zozaya et Clark, *Journ. Exp. Med.* 57, 21 (1933).

(47) Ross, *Journ. Exp. Med.* 54, 859 (1931).

(48) Avery et Goebel, *Journ. Exp. Med.* 58, 731 (1933).

CHAPITRE II

Étude de l'activité antigénique des protéides contenus dans le milieu de culture des bacilles tuberculeux

Les milieux séparés des bacilles tuberculeux sont souvent appelés des tuberculines parce qu'ils provoquent des réactions allergiques chez les sujets atteints de tuberculose. La nature et la raison d'être de ces réactions furent sujet à de nombreuses discussions. C'est ainsi qu'un grand nombre de chercheurs ont étudié l'activité antigénique de ces milieux de culture pour voir si les réactions allergiques n'étaient pas dues à une sensibilisation des organismes infectés par des principes contenus dans ces milieux. Pendant longtemps, les résultats furent négatifs, et la conception s'est affermie de plus en plus que les tuberculines sont des substances qui sont dépourvues d'activité antigénique, mais qui sont capables de provoquer des réactions allergiques chez les sujets sensibilisés. Dans cet ordre d'idées, les tuberculines seraient donc des haptènes réactionnels très particuliers.

Plus récemment, FLORENCE SEIBERT (1) a repris l'étude de la question. Cet auteur démontre que les protéides contenus dans les milieux de culture synthétiques des bacilles tuberculeux sont antigéniques, et si les anciens auteurs ont obtenu des résultats négatifs c'est qu'ils ont opéré d'une part avec des quantités très faibles de protéides actifs contenus dans un grand excès d'impuretés (glycérol, sels minéraux, peptones, etc...) et, d'autre part, parce que l'activité antigénique de ces protéides actifs fut diminuée par le chauffage auquel les tuberculines furent exposées.

Les milieux de cultures synthétiques des bacilles tuberculeux contiennent des protéides en quantités non négligeables (0.2 à 0.7 p. 1.000) et ces protéides provoquent non seulement des réactions allergiques chez les sujets tuberculeux, mais aussi la formation d'anticorps chez les sujets normaux. Ils sensibilisent enfin ceux-ci à des réactions anaphylactiques typiques. Les relations unissant celles-ci aux réactions allergiques proprement dites ont été discutées, mais elles dépassent le cadre du présent travail. La production d'anticorps par ces protéides nous intéresse plus particulièrement. Disons quand même qu'aucune relation ne paraît exister entre l'activité allergique et l'activité sérologique des préparations. La fonction qui produit des anticorps et réagit avec ceux-ci, est donc très vraisemblablement différente de l'haptène réactionnel qui provoque des réactions allergiques chez les sujets tuberculeux.

Le phénomène de la formation d'anticorps par les protéides « tuberculiniques », fut étudié plus particu-

(1) Seibert, *Journ. Inf. Dis.* 51, 383 (1932).

lièrement par SEIBERT (2), DIENES (3), puis SCHAEFER et SANDOR (4).

Nous avons choisi ce matériel d'étude pour plusieurs raisons. Tout d'abord, pour l'intérêt immunologique particulier qui s'attache à ces protéides microbiens, et aussi parce que ce sont des protéides spéciaux qui ne coagulent que partiellement par la chaleur, et dont l'état de dispersion est indépendant dans de larges mesures des processus de dénaturation habituels des protéides. La facilité avec laquelle la plupart des protéides animaux sont insolubilisés rend, en effet, très difficile l'étude de l'influence des différents agents physiques et chimiques sur leur activité antigénique.

Nous nous sommes proposé d'étudier comparative-ment l'activité fixatrice de l'alexine et l'activité antigénique in vivo des protéides tuberculiniques, et des fractions obtenues après des traitements divers de ces protéides. Nous avons ainsi adopté une méthode analytique, en voulant déterminer la nature de l'activité antigénique par les modifications que subit celle-ci au cours de changements physico-chimiques provoqués et de nature connue.

Tout d'abord, il fallait s'assurer que toutes les expériences fussent comparables. Nous avons donc toujours injecté la même quantité des différents antigènes à une série de lapins. Sachant, en outre, que les réactions sérologiques ne sont tout à fait comparables du

(2) Seibert, *Amer. Rev. Tuberc.* 21, 370 (1930).

(3) Dienes, *Journ. Immunol.* 17, 85 (1928).

(4) Schaefer et Sandor, *Ann. Inst. Pasteur* 53, p. 72 (1934).

(Tous ces auteurs ont étudié le problème de la spécificité de ces antigènes.)

point de vue quantitatif que dans une même série d'expériences, l'activité fixatrice des différents antigènes fut étudiée simultanément en présence d'un même antiserum. Nous avons de même titré les différents antisérums vis-à-vis d'un même antigène.

La méthode analytique fut poursuivie par nous pas à pas. Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la méthode de préparation de l'antigène sur l'activité antigénique. Malheureusement, la première étape dans cette étude nous échappa. En effet, nous n'avons pu contrôler l'activité antigénique du filtrat du milieu de culture tel quel, parce que celui-ci est trop dilué, et on aurait dû injecter 50 à 100 cm³ chaque fois, à un animal, pour injecter la quantité nécessaire de protéide. Les protéides furent donc précipités tout d'abord par le sulfate d'ammonium à saturation et soumis à la dialyse. La préparation ainsi obtenue constitua le point de départ de nos expériences.

Nous avons constaté bien vite que l'activité antigénique des protéides ainsi obtenus n'est déjà pas constante. Sur plusieurs préparations essayées, un certain nombre ne provoqua pas l'apparition d'anticorps dans l'organisme animal. Remarquons tout de suite que dans la méthode de préparation des animaux, nous sommes demeuré dans des conditions constantes pour avoir des résultats comparables; ainsi, il se peut que des préparations que nous avons jugées inactives, auraient provoqué la formation d'anticorps, si nous avions répété plus souvent encore les injections. En tout cas, il faut conclure que l'activité antigénique des protéides du milieu de culture obtenus dans les conditions les plus ménagées est, dès le début, fort variable.

Comme il s'agissait de protéides excrétés par les bacilles dans leur milieu de culture, nous avons pensé, au début, que l'âge de culture jouait un rôle dans la variabilité de l'activité antigénique. Cependant, au moins en ce qui concerne les cultures âgées de 4 à 6 semaines, ce facteur ne paraît pas jouer de rôle décisif. Une deuxième cause d'irrégularité pouvait provenir du fait que nos préparations protéidiques contenaient des quantités variables de polysides (SEIBERT (5), SANDOR (6)). Comme nous avons injecté un certain poids constant de substance sèche, la quantité de protéides proprement dits était variable. Cependant, ce n'est pas encore le facteur prédominant puisque des préparations relativement peu riches en azote étaient actives, tandis que d'autres, plus azotées, ne l'étaient pas.

Nous avons pensé que les différences observées dans l'activité antigénique provenaient de la concentration en sulfate d'ammonium. En effet, la précipitation fut toujours effectuée par le sulfate d'ammonium à saturation. Mais, surtout lorsqu'il s'agit, comme dans notre cas, de grands volumes de liquide, il est très difficile de s'assurer si la dissolution du sel est toujours intégrale, la température bien constante, et la concentration bien homogène. D'autre part, les expériences d'ultracentrifugation des globulines du sérum prouvent que les sels neutres, à concentrations élevées, peuvent introduire des modifications irréversibles dans la structure des protéides et que ces modifications s'accroissent à mesure que la

(5) Seibert and Munday, *Amer. Rev. Tub.* 23, 23 (1931).

(6) G. Sandor, *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*, Doin, Paris, 1935.

concentration en sel augmente (7), (8). Nous avons donc comparé l'activité antigénique d'une série de préparations protéidiques obtenues en dissolvant dans 100 cm³ de filtrat du milieu de culture, 43 g. de sulfate d'ammonium, à celle d'une autre série obtenue en présence de 60 g. de SO₄ (NH')² pour 100 cm³ de filtrat. Tous ces filtrats furent agités très souvent avant la séparation du précipité pour qu'une dissolution totale, et une distribution homogène du sel soient assurées. Nous avons trouvé que ce n'est pas la concentration du sel qui intervient pour déterminer la valeur de l'activité antigénique, puisqu'il y avait une égale proportion de préparations actives parmi les protéides obtenus à une concentration élevée, et parmi ceux précipités à une concentration plus faible en sel d'ammonium.

Le sulfate d'ammonium est un sel contenant une base faible et un acide énergique, il subit donc toujours une hydrolyse plus ou moins profonde. Ainsi, la solution saturée de sulfate d'ammonium est toujours plus ou moins acide, et comme nos filtrats sont peu tamponnés, l'acidité peut atteindre une valeur considérable (pH.3). Cependant ce n'était pas encore le facteur déterminant de l'absence de l'activité antigénique de certaines préparations, puisque dans certains cas des protéides obtenus à partir de solutions neutralisées en présence de papier au bleu de bromothymol, furent trouvés eux aussi dépourvus d'activité.

Le sulfate d'ammonium du commerce contient des quantités variables d'ions fer; ce métal lourd peut avoir

(7) Svedberg et Sjögren, *Journ. Amer. Chem. Soc.* **50**, 3318 (1928); **52**, 2855 (1930).

(8) Mutzenbecher, *Biochem. Zt.* **266**, 259 (1933).

une influence sur les protéides. Mais des protéides précipités par sulfate d'ammonium exempt de fer furent parfois inactifs, tout comme ceux obtenus à partir de sulfate d'ammonium relativement impur.

Il n'y a aucune relation entre l'activité fixatrice de l'alexine en présence des sérums antibacillaires, et l'activité antigénique proprement dite. Des haptènes actifs peuvent ne pas être antigéniques, et des haptènes relativement faibles peuvent être de bons antigènes.

Ainsi, dès le point de départ de nos études, nous avons trouvé une grande variabilité de l'activité antigénique de préparations protéidiques apparemment comparables en tous points, et aucune raison apparente n'a pu être invoquée pour expliquer ce fait. Cependant déjà ce résultat négatif présente un intérêt pratique considérable. Il nous prouve, en effet, combien il est difficile d'obtenir des résultats constants, même lorsque l'on s'efforce de travailler dans des conditions aussi comparables que possible, et combien il faut être prudent pour conclure sur la valeur d'un vaccin ou encore sur la signification de certaines variations de l'activité antigénique. En effet, dans nos expériences, certaines préparations étaient spontanément actives; d'autres ne l'étaient pas, et il aurait été inexact de conclure sur deux ou trois opérations. Il est vraisemblable que la raison de ces variations réside dans la fragilité extraordinaire de quelques protéides microbiens. Pour les protéides tuberculiniques en particulier, G. SANDOR (9) a trouvé qu'une fraction de ceux-ci est toujours coagulée définitivement, simplement par le sulfate d'ammonium. Cet auteur n'a

(9) G. Sandor, *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*, Doin, Paris, 1935.

d'ailleurs pas pu préciser les raisons plus profondes de cette coagulation. Il y a un parallélisme intéressant entre cette dénaturation quasi-spontanée de quelques protéides très labiles, et la variabilité apparemment aussi spontanée de l'activité antigénique de protéides qui ne sont pas coagulés. Nous pensons que ce parallélisme nous permet de prévoir un rôle profond joué dans l'activité antigénique par des structures purement physiques. Celles-ci sont très labiles, et se trouvent dans un équilibre métastable. De cet état, résulte le caractère, en apparence accidentel, de leur disparition qui entraîne avec elle la perte de l'activité antigénique.

Contrastant avec cette variabilité accidentelle dès le départ de l'activité antigénique, est la résistance énergétique que cette activité de nos protéides oppose à de nombreuses influences physico-chimiques. On peut dire, aussi paradoxal que cela puisse paraître, que l'activité antigénique proprement dite est plus résistante que l'activité fixatrice de l'alexine.

En effet, certaines influences, comme la chaleur et l'alcool, diminuent beaucoup le pouvoir haptène, sans porter atteinte à l'activité antigénique proprement dite. Nous avons étudié l'influence de divers facteurs qui sont d'usage courant dans la préparation des vaccins et des antigènes : la dessiccation dans le vide sulfurique, le chauffage à 120°, la précipitation par l'acide trichloracétique ou par l'alcool. Aucun de ces facteurs ne paraît avoir, tout au moins s'il n'agit que pendant une durée limitée une influence sensible sur l'activité antigénique des protéides tuberculiniques.

Nous notons, pour l'activité antigénique, deux caractères un peu contradictoires : sa disparition accidentelle

inexplicable, et sa résistance remarquable. Le rapprochement de ces deux caractères est assez déconcertant. Il faut en conclure que la structure physico-chimique dont dépend l'activité antigénique a, vis-à-vis de certains facteurs, une assez grande stabilité tandis qu'elle disparaît définitivement sous l'influence de certains autres facteurs inconnus. Pour le moment, nous pouvons dire que ces facteurs ne sont pas nécessairement des processus hydrolytiques; disons aussi que nos efforts pour en découvrir la nature furent infructueux jusqu'à ce jour.

A côté de l'activité antigénique proprement dite, il est important, du point de vue pratique, de considérer aussi la spécificité antigénique. Nous savons, en effet, que certaines influences, telles la chaleur, peuvent modifier les antigènes protéidiques de telle façon que les anticorps auxquels ils donnent naissance, réagissent de préférence avec les antigènes modifiés sans réagir, ou en ne réagissant que très peu avec les antigènes originels. OBERMAYER et PICK (10). Du point de vue de l'immunité contre les maladies infectueuses, ces faits peuvent avoir leur importance, puisqu'il n'est pas dit que les anticorps humoraux engendrés par des vaccins modifiés peuvent encore avoir une influence sur les bacilles vivants qui tendent à envahir l'organisme. Nous avons donc tenu à vérifier aussi ces possibilités et nous avons trouvé que les anticorps qui prennent naissance par l'injection de protéides tuberculiniques modifiés par la chaleur, réagissent mieux avec ceux-ci qu'avec les protéides non traités. Cette influence paraît donc modifier la spécificité antigénique de ces protéides microbiens.

Dans l'étude de l'influence de l'acide trichloracé-

(10) Obermayer et Pick, *Wien Klin Woch* 19, 327 (1906).

tique, les conditions sont plus complexes. Celui-ci sépare, en effet, les protéides des polyosides, et dans cette étude, il s'agissait, avant tout, de déterminer si les anticorps formés par l'injection du protéide originel, réagissent avec les protéides proprement dits, ou avec la fraction polyosidique. A ce sujet, les résultats obtenus par nous-même, comme ceux de SANDOR et SCHAEFER, sont assez contradictoires. Certains sérums antiprotéidiques réagissent de préférence avec les protéides purifiés, et d'autres avec les polyosides bruts qui ont été étudiés.

Sous l'action de l'acide trichloracétique, les protéides furent séparés des polyosides. Les polyosides obtenus dans les conditions de nos expériences sont, en général, exempts d'azote. Comme nous l'avons déjà dit, les protéides purifiés ainsi obtenus ont gardé intacte leur activité antigénique. Un fait, excessivement intéressant, mais qui doit être vérifié, est que le polyoside, dans une expérience, a provoqué lui aussi la formation d'anticorps. Bien que ce fait doive être vérifié sur de nouvelles préparations, nous le mentionnons, car il prouve une fois de plus combien il faut être prudent dans les expériences d'activation des haptènes, puisque ces principes peuvent provoquer à eux seuls la formation d'anticorps lorsqu'ils ne sont pas d'une pureté absolument rigoureuse.

Dans nos immunsérums obtenus par injection à l'animal de protéides purifiés et de polyosides, les anticorps paraissent se scinder en anticorps antiprotéidiques, et en antipolyosides spécifiques. En effet, les sérums antiprotéides purifiés ne réagissent pas avec les polyosides, et le sérum antipolyosidique ne réagit pas avec les protéides purifiés. La spécificité antigénique des protéides purifiés et des polyosides apparaît donc ici nettement.

DESCRIPTION DES EXPERIENCES

PRÉPARATION DU PROTÉIDE TUBERCULINIQUE

Nous nous sommes servi du milieu de culture dans lequel s'étaient abondamment développés des bacilles tuberculeux (Souche Bovine VALLÉE, ensemencée sur milieu de Sauton, et récoltée après 4 à 6 semaines). On jette les cultures sur papier filtre, qui retient les corps bacillaires, puis le milieu est passé sur filtre bactériologique (filtre de Seitz). Au filtrat, on ajoute du sulfate d'ammonium, de 430 g. à 600 g. par litre. Il se forme un précipité floconneux, on agite de temps à autre, et on laisse en présence pendant 24 heures. On centrifuge alors pendant dix minutes. Le culot de centrifugation est remis en solution dans l'eau distillée et on alcalinise par Na-OH N/5 jusqu'à teinte verdâtre du papier au bleu de bromothymol. La solution est soumise à la dialyse dans un sac en collodion, en présence d'un cristal de thymol, pendant 48 heures contre de l'eau courante, puis 24 heures contre de l'eau distillée.

Le contenu du dialyseur est alors centrifugé. Le liquide décanté constitue la solution protéidique que nous allons étudier. Le culot est repris par un peu d'eau distillée, lavé et centrifugé. Les eaux de lavage sont réunies à la solution mère. Le culot est constitué par des protéides dénaturés, complètement insolubles dans l'eau, les alcalis et les acides dilués. Dans ce travail, nous ne nous occuperons pas de ce culot.

Cette solution protéidique, appelée aussi fraction A, est amenée à dessiccation dans le vide sulfurique en

présence de thymol pulvérisé, puis recueillie sous forme d'une poudre allant du brun noirâtre au jaune clair suivant les préparations. Nous l'avons appelée fraction B. Cette poudre, maintenue au vide sulfurique, se conserve très longtemps sans aucune altération, comme nous l'avons constaté au cours de notre travail. Les propriétés du protéide ne sont en rien modifiées, et A et B étant semblables, nous n'avons donc ultérieurement utilisé que la fraction B, d'une conservation aisée.

DÉTERMINATIONS SÉROLOGIQUES

Détermination du pouvoir haptène

Nous avons toujours déterminé le pouvoir haptène de nos préparations en présence de différents sérums de la façon suivante.

Nous avons effectué la réaction de déviation de l'alexine en mettant en présence dans chaque tube : 0 cm³ 25 de notre antigène, à des dilutions croissantes et 0 cm³ 25 de l'antisérum, avec 0 cm³ 25 l'alexine diluée convenablement (dose correspondant à 2 unités 1/2 d'alexine). (Nous avons utilisé comme antisérums, 1° le sérum du cheval 65 qui avait reçu plusieurs injections de bacilles B. C. G. vivants et 2° nos sérums antiprotéidiques préparés par l'injection à des lapins de nos différentes préparations.)

On porte à l'étuve à 37° pendant une heure. Puis on ajoute 0 cm³ 5 d'un mélange à parties égales de globules rouges de mouton à 5 p. 100 et de sérum

hémolytique (3 à 5 doses minima lysantes) on porte de nouveau à l'étuve pendant 15 à 30 m.

Les chiffres rapportés représentent le poids minima (en mg.) de notre protéide ayant encore fixé 2 unités $1/2$ d'alexine.

Nous avons toujours préalablement déterminé le pouvoir anticomplémentaire de notre substance.

Immunisation des lapins

Pour examiner l'activité antigénique de nos protéides dans des conditions comparables, nous avons toujours injecté la même quantité de substance, en un même nombre de piqûres, et dans de mêmes intervalles de temps. Les lapins ont reçu six injections intraveineuses (dans la veine marginale de l'oreille) de 10 mg. de protéide, soit, pour chaque lapin, 60 mg. de protéide en tout.

Lorsque nous avons employé des protéides non deséchés (fraction A), la teneur des solutions en protéides fut déterminée par un dosage d'azote, d'après la méthode de KJELDAHL.

Etant donné que nos protéides bruts sont constitués par un mélange de protéides et de polysides — Seibert (11), Sandor (12) — le chiffre obtenu par le dosage d'azote doit être multiplié par un facteur empirique, différent de celui qui est applicable aux protéides classiques. La teneur en azote des protéides bruts oscille en général au voisinage de 11 p. 100, nous avons donc

(11) Seibert and Munday, *Amer. Rev. Tub.*, 23, 23 (1931).

(12) G. Sandor, *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*, Doin, Paris, 1935.

multiplié le chiffre d'azote trouvé par 8.9, pour avoir la teneur en protéide.

Exemple : Pour une préparation, nous avons eu 0 mg. 427 d'N par cm³.

En multipliant ce chiffre par 8.9, nous avons déterminé le poids en protéide brut, soit $0.427 \times 8.9 = 3$ mg. 8. Nous avons donc injecté chaque fois 2 cm³ 63 de la solution.

Dix jours après la dernière injection, nous avons saigné nos animaux et déterminé la richesse de leur sérum en anticorps.

Détermination du pouvoir antigénique

Nous avons procédé comme pour le titrage du pouvoir haptène, mais en laissant fixes les doses d'antigène, et en utilisant l'antisérum à des dilutions croissantes. La teneur en anticorps fut exprimée selon la formule de CALMETTE-MASSOL : nombre d'unités d'alexine déviées, divisé par le volume du sérum examiné.

Nous avons préalablement saigné nos animaux, avant le début de nos expériences, pour rechercher la présence d'anticorps naturels dans le sérum : les examens furent négatifs.

Nous avons ainsi étudié en tout une vingtaine de préparations, dont une moitié fut inactive, et l'autre dizaine possédait une activité antigénique plus ou moins grande, mais toujours nette.

ORIGINE ET CONDITIONS DE PRÉPARATION
DES PROTÉIDES
ET LEUR ACTIVITÉ ANTIGÉNIQUE

Age du milieu de culture

Nos premières préparations antigéniques *in vivo* furent obtenues à partir d'un milieu de culture de quatre semaines; nous préparâmes ensuite des protéides à partir du milieu de culture âgé de six semaines — nous eûmes une série de préparations inactives. Par la suite nous eûmes des produits actifs, à partir des milieux âgés de six semaines. Il semble cependant qu'à partir du milieu moins vieux, on obtienne des préparations plus actives, sans pouvoir dire que le vieillissement du milieu ait une action décisive sur l'activité antigénique de notre substance (tableau n° 1).

TABLEAU I

*Age de la culture et activité antigénique
des protéides tuberculiniques*

PRÉPARATION N°	I	II	III à VI	VII	VIII à X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
Age exprimé en semaines	4	4	6	5	6	5	7	4	6	6	6	6	4	6
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ de sérum homologue	400	400	0	0	0	50	0	50	100	10	0	10	800	10
	400	800				0		100	100			100		

Teneur en Azote

Le protéide tuberculinique que nous obtenons est un mélange de protéides proprement dits et de polyo-

sides. Il aurait pu se produire que les préparations inactives soient moins riches en azote que celles actives. Nous avons donc déterminé la teneur en azote d'un certain nombre de nos préparations, par la méthode de Kjeldahl. Nous résumons dans le tableau ci-dessous, les résultats obtenus (Tableau n° II).

TABLEAU II

*Teneur en azote et activité antigénique
des protéides tuberculiniques*

PRÉPARATION n°	II	VIII	IX	XI	XII	XIII	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX
Teneur en azote N pour 100	8.44	8.08	9.46	a/11.21 b/11.65	6.75	11.96	13.23	10.71	a/8.32 b/8.94	13.22	13.73
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'an- tisérum homologue	400 800	0	0	a/50 b/0	0	100 100	10 0	0	a/10 b/100	800	10

De la lecture de ce tableau, il nous apparaît qu'il ne semble pas y avoir de relation définie entre la teneur en azote de nos protéides et leur activité antigénique *in vivo*. En effet, la préparation XIX était peu active tout en étant très riche en azote, alors que la préparation XVIII, dont la teneur en azote était légèrement moindre, possédait une activité antigénique très grande.

*Concentration et pureté du sulfate d'ammonium
Réaction du milieu*

Pour obtenir nos deux premières préparations antigéniques, nous avons précipité le protéide de notre milieu de culture, par 430 g. de sulfate d'ammonium

par litre; dans les trois suivantes, inactives, par 600 g. Nous avons vu, par la suite, en précipitant le protéide du milieu de culture tantôt par 430 g. par litre, tantôt par 600 g. de sulfate d'ammonium, que la concentration de ce sel n'avait aucune action sur l'activité antigénique de notre substance.

TABLEAU III

*Concentration du sulfate d'ammonium
et activité antigénique des protéides tuberculiniques*

PRÉPARATION N°	I, II	III, IV V	VI, VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII XIV	XV XVI	XVII	XVIII	XIX
Concentration en sulfate d'ammonium (en gr. par litre)	430	600	430 600	430	600	430 600	430 600	430	430	430	430 600	600	600
Activité antigénique in vivo.	+	0	0	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+

Ainsi les préparations II et XVIII, obtenues par précipitation du protéide respectivement par 430 g. et par 600 g., étaient très actives, alors que les préparations XII et III, obtenues par précipitation avec doses correspondantes de sulfate d'ammonium, étaient inactives (Tableau n° III).

Notons ici que dans certaines préparations, nous avons, après addition du sulfate d'ammonium, neutralisé notre milieu de culture, avec de la soude N/5 (jusqu'à virage à la teinte verdâtre du papier au bleu de bromothymol); dans d'autres cas, nous n'avons pas modifié le pH de notre milieu, sans que nous puissions remarquer une différence dans l'activité du précipité de protéides.

Nous avons pensé, à un moment donné, que des impuretés (sels de métaux lourds par exemple) contenues dans notre sulfate d'ammonium, pouvaient modifier la substance active de notre fraction protéidique. En précipitant dans un même milieu de culture, les protéïdes, par un sulfate d'ammonium neutre purifié et par un autre impur, nous n'avons relevé aucune différence dans l'activité des deux préparations ainsi obtenues;

Activité fixatrice et action antigénique

Nous avons remarqué, en étudiant parallèlement l'activité fixatrice de nos protéïdes en présence du sérum d'un cheval qui avait reçu plusieurs injections de bacilles B. C. G. vivants, et leur pouvoir antigénique *in vivo*, en présence des antisérums homologues, qu'il n'y a aucun lien apparent entre ces deux fonctions de notre fraction protéidique, comme on peut le voir nettement par le tableau n° IV.

TABLEAU IV

*Relation entre l'activité fixatrice de l'alexine
et l'activité antigénique des protéïdes tuberculiniques*

PRÉPARATION N°	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
Activité fixatrice en présence de sérum de cheval anti B. C. G.	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{4}$	0	0	$\frac{1}{240}$
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'antisérum homologue	400 400	400 800	0	0	0	0	0	0	0	0	50 0	0	100 100	200 200	10	0	10 100	800

ETUDE DES PREPARATIONS ACTIVES

Sur celles de nos préparations possédant une activité antigénique *in vivo*, nous avons étudié l'action d'un certain nombre de facteurs.

INFLUENCE DE LA DESSICATION

Nous avons tout d'abord préparé parallèlement trois séries d'animaux, avec notre fraction A, fraîchement dialysée, et la même fraction desséchée au vide sulfurique.

Après la récolte des sérums et le titrage de leur richesse en anticorps, en suivant le protocole expérimental précédemment décrit, nous avons réuni les résultats obtenus dans le tableau n° V.

TABLEAU V

Influence de la dessication sur l'activité antigénique des protéïdes tuberculiniques

PRÉPARATION N°	I		II		III	
	A	B	A	B	A	B
Activité fixatrice en présence du sérum de cheval anti B. C. G.	en mmg 1/16	1/16	1/42	1/8	1/16	1/16
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'antisérum homologue	100	125	200 400	800 800	0	0

A == fraction non desséchée.

B == fraction desséchée.

Par la lecture du tableau V, nous voyons que : 1°) l'activité fixatrice de nos deux préparations, en présence d'un même sérum de cheval anti B. C. G. a la même valeur; 2) l'activité antigénique de nos protéides n'est pas altérée par la dessiccation au vide sulfurique.

Nous avons donc, par la suite, toujours préparé et conservé au vide sulfurique nos fractions protéidiques aisément périssables à l'air libre.

Quatorze mois plus tard, nous avons immunisé deux nouveaux lapins avec notre préparation n° II. Après titrage de leurs sérums, nous avons retrouvé la même richesse en anticorps que pour les lapins immunisés quatorze mois auparavant. Ce qui démontre bien que le temps n'altère pas nos produits ainsi conservés.

INFLUENCE DE LA CHALEUR

Préparation

Nous sommes partis, soit de la solution protéidique A, soit de la fraction B (dans ce cas nous avons préalablement remis notre protéide en solution). Nous soumettons notre solution protéidique à l'action de l'autoclave à 120°, pendant vingt minutes. Ce chauffage provoque une coagulation partielle de notre protéide. On centrifuge. Le culot est abandonné. Le volume de la solution décantée est mesuré et on ajoute 9 p. 100 de chlorure de sodium. Il se produit un trouble — on centrifuge de nouveau — et la solution décantée constitue notre fraction C.

Elle fut utilisée parfois immédiatement, parfois mise au vide sulfurique jusqu'à dessiccation, le résidu, en poudre, était remis en solution au moment opportun.

Immunisation des lapins

Nous avons préparé des animaux suivant notre technique habituelle, les uns avec le protéide initial, les autres avec notre fraction chauffée.

Après récolte des immunsérums, nous avons déterminé leur richesse en anticorps. Dans le tableau VI sont rassemblés les résultats obtenus.

TABLEAU VI

Influence de la chaleur

sur l'activité antigénique des protéides tuberculiniques

PRÉPARATION N°	I		IV		XIV		XIX	
	a ou b	c	a ou b	c	b	c	b	c
Activité fixatrice en présence du sérum de cheval anti B. C. G.	en mmg 1/40	1/10	1/32	1/16	1/80	1/40	0	1/4
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'antisérum homologue	800	400	0	0	400	50	10	100

a ou b = fraction primitive.

c = fraction chauffée.

Nous en déduisons : 1°) que la chaleur diminue l'activité fixatrice de nos protéides, en présence du sérum anti B. C. G.; 2°) que la chaleur n'altère pas très sensiblement l'activité antigénique des protéides tuberculiniques — et ce fait est extrêmement curieux.

ACTION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

Préparation du précipité trichloracétique (fraction D)

Comme pour l'étude de l'action de la chaleur, nous sommes partis d'une solution protéidique A, ou de la fraction B remise en solution.

Après avoir mesuré le volume de la solution, on additionne d'acide trichloracétique à 8 p. 100. Il se produit un abondant précipité blanchâtre — on agite et on laisse en présence pendant une heure — puis on centrifuge pendant dix minutes. Le liquide décanté constitué par les eaux-mères acides, est recueilli. Nous l'appellerons D¹.

Le culot est repris par l'eau, à la neutralité (coloration verdâtre du papier au bleu de bromothymol). On met à la glacière. Le lendemain, après mesure du volume de la solution, on ajoute de nouveau l'acide trichloracétique à 8 p. 100; après agitation, le précipité formé est centrifugé au bout d'un quart d'heure.

Le liquide décanté est réuni à D¹.

Le culot est repris encore une fois par l'eau, puis précipité par l'acide trichloracétique. Le précipité est rassemblé par centrifugation, le liquide surnageant est réuni à D¹. Le culot est repris par l'eau, remis en solution à la neutralité, puis mis à dialyser dans un sac en collodion, en présence d'un cristal de thymol, pendant 48 heures contre de l'eau de source courante, puis 24 heures contre de l'eau distillée.

Le contenu du dialyseur est alors centrifugé, le culot est abandonné, le liquide décanté est amené à dessiccation dans le vide sulfurique. Il constitue la fraction précipitée par l'acide trichloracétique, fraction com-

posée de protéides exempts de glucides, ou *fraction D*.

Cette fraction est constituée par un protéide relativement pur. En effet, elle contient 14,7 % d'azote, des traces de polysides (réaction de Molisch positive) et 6 à 7 % de substances lipoidiques.

Préparation du polyside — fraction D₁

On mesure le volume de la solution D₁, obtenue de la façon que l'on vient de décrire. On lui ajoute deux fois son volume d'alcool et un volume d'éther. Il apparaît un précipité blanc très fin; après 24 heures de repos, on centrifuge. Le liquide décanté est rejeté. Le culot est remis en solution dans l'acide trichloracétique à 8 p. 100. Par centrifugation, on élimine ce qui est insoluble. A la solution décantée, on ajoute de nouveau le mélange alcool-éther dans les mêmes proportions. Le précipité formé, séparé par centrifugation, est lavé par deux fois à l'éther en centrifugant, puis finalement mis dans le vide sulfurique. On obtient ainsi une poudre blanche ou blanc grisâtre, appelée *fraction D₁*.

Celle-ci contient des polysides dont la teneur en azote est indosable et qui réduisent après hydrolyse acide comme 87 à 90 % de leur poids de glucose.

Détermination de l'activité antigénique des fractions D et D₁

Nous avons préparé, parallèlement, plusieurs séries de lapins, avec notre protéide primitif, le protéide purifié et le polyside. Nos déterminations sérologiques furent faites selon notre méthode habituelle.

TABLEAU VII

*Influence de l'acide trichloracétique
sur l'activité du protéide tuberculinique*

PRÉPARATION N°	II			IV			XVIII		
	B	D	D ¹	B	D	D ¹	B	D	D
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'antisérum homologue	400	200	/	0	0	0	800	200	100
	800		a)						

B = fraction primitive. — D = protéide purifié. — D¹ = polyoside.

a) Le poids de D¹ obtenu fut insuffisant pour immuniser des animaux.

L'acide trichloracétique n'a pas détruit le pouvoir antigénique de notre fraction, puisque dans les deux cas où la fraction primitive fut active, les protéides purifiés engendrèrent également des anticorps; et, fait intéressant, malheureusement isolé pour l'instant, et que nous tenterons de confirmer, la fraction polyosidique elle-même a déterminé la formation d'anticorps chez l'animal inoculé. Possédant trop peu de cette fraction polyosidique active, nous n'avons pas pu en faire l'analyse chimique et vérifier l'absence d'azote.

ACTION DE L'ALCOOL

En général, l'alcool dénature et précipite les protéides. La dénaturation dépend de différents facteurs tels que la température, la concentration et la durée d'action de l'alcool sur les protéides. La précipitation elle-même dépend aussi de certains facteurs, tels que le pH de la solution protéidique, et pour certains pro-

téides, l'alcool ne détermine jamais une précipitation quantitative.

Il en est ainsi pour les protéides tuberculiniques, lesquels ne sont jamais complètement précipités par l'alcool. Ainsi, dans notre étude concernant l'action de l'alcool sur les protéides tuberculiniques avons-nous obtenu deux fractions protéidiques, une première précipitée, et une seconde demeurée dans les eaux-mères alcooliques. Ces deux fractions furent étudiées isolément, quoique composées toutes deux de protéides.

Nous avons, à un volume connu d'une solution protéidique, ajouté cinq volumes d'alcool absolu, et un volume d'éther; on laisse en présence pendant vingt-quatre heures, à la température du laboratoire, puis la précipité obtenu est rassemblé par centrifugation.

Le liquide décanté E_1 est recueilli.

Le culot est lavé par l'éther, deux fois de suite, puis amené à dessiccation dans le vide sulfurique.

Les eaux alcooliques E_1 sont concentrées par distillation dans le vide, à basse température, pour éliminer l'alcool. La solution concentrée est recueillie; on lave le ballon à plusieurs reprises, avec un peu d'eau distillée, en réunissant les eaux de lavage à la solution-mère, puis on dessèche dans le vide sulfurique.

Immunisation de lapins

A partir de ces deux fractions E (précipité par l'alcool) et E_1 (eaux-mères alcooliques), nous avons immunisé des animaux, toujours suivant le protocole habituel.

Nous avons déterminé la richesse en anticorps des

immunsérums obtenus, et nous résumons dans le tableau VIII, nos résultats. Nous voyons que les sérums d'animaux inoculés avec ces fractions possédaient des anticorps quand le protéide brut primitif sur lequel nous avons opéré le fractionnement avait lui-même une activité antigénique.

TABLEAU VIII

*Influence de l'alcool sur l'activité antigénique
des protéides tuberculiniques*

PRÉPARATION N°	V			XVII			XIX		
	B	E	E ¹	B	E	E ¹	B	E	E ¹
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ d'antisérum homologue	0	0	0	100	(1)	10	10	200	200

B = fraction primitive. — E = précipité alcoolique.

E¹ = Eaux-mères alcooliques.

(1) Les deux lapins, préparés avec cet extrait, moururent, l'un immédiatement après la 3^e injection, l'autre après la 4^e, d'un choc anaphylactoïde.

Dans les conditions où nous avons travaillé, l'alcool ne détruit pas l'activité antigénique.

ETUDE DE LA SPECIFICITE DES ANTICORPS

Nous venons de voir que dans le cas particulier qui nous intéresse, celui des protéides du milieu de culture des bacilles tuberculeux, les divers agents expérimentés n'ont pas détruit l'activité antigénique de notre préparation.

Un autre aspect du problème, et non moins intéres-

sant, était de savoir si les diverses actions exercées sur ce protéide n'avaient pas altéré sa spécificité antigénique. Nous savions déjà que la chaleur, en particulier, peut donner naissance à une nouvelle spécificité (Pick et Obermayer). Nous avons donc, tout naturellement, cherché à contrôler par nous-même ce phénomène.

ACTION DE LA CHALEUR

Nous avons réuni dans le tableau IX les résultats obtenus pour deux de nos préparations ayant subi l'action de l'autoclave à 120°.

Pour les méthodes de préparation de nos fractions et d'immunisation des animaux, nous renvoyons à ce qui a été décrit dans le précédent chapitre (voir p. 46 et suiv.).

TABLEAU IX

*Action de la chaleur
sur la spécificité antigénique*

PRÉPARATION N°		XIV		XIX	
		Protéides primitifs	Protéides chauffés	Protéides primitifs	Protéides chauffés
Unités d'alexine fixées par 1cm ² de sérum	antiprotéide primitif	400	50	50	50
	antiprotéide chauffé	0	50	0	100

Dans les deux cas étudiés, le protéide chauffé a réagi avec l'antisérum d'animal immunisé avec le protéide primitif, le protéide primitif n'a pas réagi en présence de l'immunsérum de l'animal ayant reçu le

protéide chauffé. Des anticorps nouveaux seraient apparus dans le sérum des animaux ayant reçu la fraction chauffée. Une nouvelle spécificité se serait créée; avant de l'admettre d'une façon définitive, nous devons amplifier nos expériences, étant donné le petit nombre de nos résultats actuels.

ACTION DE L'ALCOOL

Dans le seul cas que nous avons étudié (préparation XIX), l'alcool n'a pas déterminé l'apparition d'une spécificité nouvelle (tableau X). En effet, les différentes fractions réagissent d'une façon absolument comparable en présence des différents antisérums.

TABLEAU X

Influence de l'alcool sur la spécificité

PRÉPARATION XIX		Protéides primitifs	Précipité alcoolique	Eaux-mères alcooliques
Unités d'alexine fixées par 1cm ³ de sérum anti-	protéide primitif	10	100	100
	précipité alcoolique	10	200	100
	eaux-mères alcooliques	10	200	200

ACTION DE L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE

L'action de l'acide trichloracétique, que nous allons étudier maintenant, est plus complexe. Cet agent fractionnant notre protéide initial, en protéides purifiés, et en une fraction polysidique. Il s'agissait donc de déterminer d'une part, si le protéide brut (mélange de

protéides et de polyosides) provoquait la formation d'anticorps anti-protéides purifiés, et anti-polyosides; d'autre part, de savoir si les anticorps anti-protéides purifiés, et anti-polyosides, étaient différents. Nous avons donc déterminé l'activité fixatrice de ces deux fractions, en présence de sérums de lapins immunisés avec le protéide total homologue.

TABLEAU XI

Activité fixatrice des protéides purifiés et des polyosides en présence d'immunsérums préparés par injection de protéides totaux

PREPARATION N ^o		Sérums de lapins antiprotéides bruts				
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>
		mmgr.				
<i>a</i>	{ Protéides purifiés....	1/108				
	{ Polyosides	1/36	1/243			
<i>b</i>	{ Protéides purifiés....	0	1/16			
	{ Polyosides	1/32	1/2000			
<i>c</i>	{ Protéides purifiés....			1/64	1/64	
	{ Polyosides			0	0	
<i>d</i>	{ Protéides purifiés....					1/40
	{ Polyosides					1/80

Les résultats enregistrés sont assez contradictoires. Certains sérums ont réagi plus particulièrement avec les polyosides; d'autres, au contraire, ont présenté une affinité majeure pour les protéides purifiés.

Ainsi le sérum *b* n'a pas réagi, ou peu, avec le protéide purifié, alors qu'il a fixé fortement l'alexine en présence de fractions polyosidiques. Inversement, les sérums *c* et *d*, se sont montrés inactifs en présence du po-

lyoside — et n'ont présenté une activité qu'en présence des protéides purifiés.

Etudions maintenant la nature des anticorps engendrés par l'injection chez l'animal, de fractions protéïdiques purifiées par l'acide trichloracétique, ou de fractions polyosidiques.

Les anticorps créés par l'injection de polyosides, ne réagissent pas avec les protéides purifiés, et inversement ceux engendrés par les protéides purifiés sont inactifs en présence de la fraction polyosidique (tableau XII).

TABLEAU XII
*Spécificité des anticorps
formés par l'injection des protéides
et des polyosides isolés.*

PREPARATION XVIII	Sérum anti protéide brut		Sérum anti protéide purifié		Sérum anti polyoside	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo.
Protéides bruts	$\frac{1}{600}$	800	1/4	200	1/4	200
Protéides purifiés	$\frac{1}{40}$	200	1/4	200	1/4	0
Polyosides.....	$\frac{1}{80}$		0	0	1/40	100

1^{re} colonne : activité fixatrice, dose minima (en mmgr.) fixant 2,1/2 unités d'alexine.

2^e colonne : pouvoir antigénique-unités d'alexines fixées par 1cm³ d'anti-sérum.

Il est certain que nous sommes en présence de deux antigènes distincts engendrant des anticorps bien spéci-

fiques. Ces expériences demandent une confirmation, car elles sont pour le moment encore, isolées.

RÉSUMÉ.

L'activité antigénique des protéïdes contenus dans les milieux de culture des bacilles tuberculeux n'est pas constante. L'existence de cette fonction est apparemment indépendante de conditions telles que l'âge de la culture, la concentration du sel d'ammonium qui sert à la précipitation des protéïdes, la pureté de ce sel, indépendante aussi de l'acidité des eaux-mères de précipitation et de l'activité fixatrice des protéïdes.

Si une préparation est active, son activité résiste très fortement à la chaleur. En effet, elle n'est pas détruite par un chauffage à 120° pendant 20'. La précipitation par l'alcool, ou l'acide trichloracétique ne diminue pas non plus sensiblement l'activité antigénique.

La spécificité antigénique, par contre, paraît être modifiée sous l'influence de la chaleur. En effet, les antisérums obtenus avec des préparations chauffées réagissent avec celles-ci, tout en demeurant indifférents en présence des préparations non chauffées.

Les protéïdes tuberculiniques bruts sont constitués par un mélange de protéïdes et de polyosides. Sous l'influence de l'acide trichloracétique, ces deux groupes de principes peuvent être séparés. La nature des anticorps auxquels les protéïdes bruts donnent naissance, paraît être variable. Ces anticorps réagissent, dans certains cas, en présence de protéïdes purifiés; dans d'autres, en présence de la fraction polyosidique.

Les protéides purifiés, par contre, donnent naissance à des anticorps qui ne réagissent qu'en présence de ces protéides. Il en a été de même pour la fraction polyosidique, dans le cas où nous avons obtenu des anticorps par injection à l'animal de l'une de nos préparations polyosidiques.

CHAPITRE III

Étude des protéides du corps bacillaire et du rôle haptène en présence du sérum du cheval anti B. C. G., des protéides et des polysides du milieu de culture et des corps bacillaires

Nous avons étudié la constitution chimique et les propriétés antigéniques d'un autre type de préparations protéidiques que nous avons obtenues à partir des corps bacillaires. Les bacilles vivants furent lavés à l'eau distillée, puis déshydratés et tués par l'alcool absolu à basse température (de -5 à -10°), enfin dégraissés à l'éther froid. Dans ces conditions, nous avons obtenu un stroma protéidique aussi peu dénaturé que possible. Ces corps bacillaires furent desséchés dans le vide sulfurique, et, après broyage avec du sable de Fontainebleau dans un mortier, soumis à l'agitation pendant plusieurs heures avec des billes de verre en présence d'un tampon de phosphate $\frac{N}{15}$ légèrement alcalin (de pH 8 à 8,2 à peu près). La peptisation des pro-

téides se continua pendant 4 jours à la glacière, avec une seule agitation quotidienne d'une heure. SANDOR et PEREZ (1) ont démontré que le rendement en protéides est optimum dans ces conditions. En effet, les chiffres rapportés par ces auteurs montrent nettement que l'extraction doit être conduite à la glacière et qu'il n'y a pas intérêt à renouveler le solvant et à continuer l'extraction au-delà de *quatre* jours.

L'extrait fut filtré sur papier, puis sur filtre bactériologique. Dans des essais préliminaires, nous avons vu que cet extrait fixe fortement l'alexine en présence d'un sérum de cheval anti B. C. G. et que l'activité fixatrice ne traverse pas les dialyseurs. Tout au contraire, la dialyse enrichit très fortement l'activité fixatrice rapportée à l'unité de poids de substance sèche, puisqu'on élimine une grande quantité de substances inertes du point de vue sérologique. En général, nous avons donc soumis nos extraits à la dialyse, puis nous les avons desséchés dans le vide sulfurique. La poudre ainsi obtenue constitue le protéide brut du corps bacillaire, et comme les analyses chimiques le prouvent, il s'agit encore d'un mélange complexe de protéides et de polysides. Contrairement aux protéides du milieu de culture, ces protéides bruts sont de très bons antigènes qui donnent toujours naissance à des anticorps en abondance. Comme les protéides tuberculiniques, ils résistent très fortement à la chaleur qui n'a aucune influence sur leur activité antigénique.

Enfin, dans une dernière série d'expériences, nous

(1) Sandor et Perez, voir Sandor, **Contribution à l'étude des microbes pathogènes**, Paris, 1935, Doin, édit., p. 113 et suivantes.

avons étudié la spécificité antigénique des différents haptènes bacillaires et le rôle respectif de ces haptènes en présence de sérum antibacillaire (sérum de cheval anti B. C. G.). Cette question est assez discutée, et si plusieurs auteurs ont émis l'idée que les anticorps contenus dans le sérum des tuberculeux réagissent seulement avec les haptènes contenus dans les extraits lipoidiques des bacilles : PINNER (2), WITEBSKY (3), il paraît actuellement démontré que les substances complexes hydrosolubles réagissent également d'une façon spécifique en présence de ces sérums (SCHAEFER et SANDOR) (4). Nous avons pu vérifier, dans le travail de ces derniers auteurs, ce qui a trait à la spécificité sérologique des protéides en général. En effet, jamais des antigènes contenus dans les extraits méthyliques des corps bacillaires n'ont réagi avec les antisérums protéidiques quels qu'ils soient (bacillaires ou tuberculiniques).

Nous avons trouvé un autre fait intéressant en ce qui concerne le groupe des anticorps que nous avons appelés « protéidiques ». Ces anticorps réagissent avec le mélange des protéides et de polyosides qui constitue nos protéides bruts, et dans le cas des protéides tuberculiniques comme dans celui des corps bacillaires, lorsqu'on fractionne les protéides bruts en polyosides et protéides, l'activité haptène fixatrice de l'alexine est toujours concentrée dans la fraction polyosidique. Il est ainsi vraisemblable que l'haptène bacillaire qui, dans nos extraits, réagit avec les anticorps contenus dans les sérums de

(2) Pinner, *Amer. Rev. of Tuberc.* 21, 1930, p. 370.

(3) Witebsky et R. Klingenstein, *Klin. Wochenschr.*, 1932, p. 97.

(4) Schaefer et Sandor, *Ann. Inst. Past.* 53, 72 (1934).

tuberculeux, est un « antigène résiduel », c'est-à-dire un principe qui se trouve avec les polyosides.

Il était très important de voir si l'haptène du corps bacillaire est identique ou différent de l'haptène du milieu de culture. DIENES (5) et HEIDELBERGER (6) prétendent avoir isolé différents haptènes protéidiques et polyosidiques à partir des corps bacillaires, comme du milieu de culture. Cependant, SANDOR (7) insiste sur le caractère peu précis de ces distinctions. Comme nous l'avons vu nous-même pour les sérums expérimentaux, il est très difficile de faire une distinction nette même entre anticorps protéidiques et polyosidiques. D'autre part, nous avons trouvé qu'en présence des sérums antibacillaires (anti B. C. G.), l'haptène de nos extraits aqueux tend toujours à se concentrer dans le polyoside. Nous avons tenu à vérifier, par une voie sérologique, si les deux antigènes « résiduels », celui du corps bacillaire et celui du milieu de culture, sont identiques ou différents. Pour ce faire, nous avons comparé l'activité fixatrice des deux types de protéides bruts en présence des antisérums du type bacillaire, et du type milieu de culture. Les anticorps contenus dans les deux groupes de sérums paraissent être identiques. En effet, ils réagissent toujours également avec les deux types de protéides. Avant de conclure, il faudrait encore faire des essais de saturation des anticorps, mais il y a déjà grande vraisemblance pour que nous ayons un même haptène

(5) Dienes, *Journ. Immunol.* 17, 85 (1928).

(6) Heidelberg et Menzel, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 29, 631 (1932); *Journ. Biol. Chem.* 104, 654 (1934).

(7) Sandor, *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*, Paris, 1935.

protéido-polyosidique dans les bacilles tuberculeux et dans le milieu de culture de ces bacilles.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la structure antigénique du bacille tuberculeux se dessine d'une façon relativement très simple. En effet, deux anticorps différents paraissent seuls exister dans les sérums de tuberculeux : un anticorps de type lipoïdique et un autre de type polyosidique, avec peut-être de faibles traces d'anticorps protéïdiques proprement dits.

D'autre part, les travaux de M. A. MACHEBŒUF et de ses collaborateurs (8) semblent prouver qu'il n'y a qu'un seul haptène lipoïdique bacillaire; nos recherches personnelles nous orientent aussi vers l'idée qu'une seule substance hydrosoluble constitue l'autre type des haptènes bacillaires. MUCH, K. MEYER (9), DIENES (10) et HEIDELBERGER (11), ont distingué entre plusieurs haptènes lipoïdiques, protéïdiques et polyosidiques. Nous pensons qu'il s'agissait, dans leurs expériences, d'une ou de deux substances actives entraînées par adsorption par différentes substances inertes. Ainsi SANDOR et NINNI (12) ont montré comment l'antigène lipoïdique est entraîné par différents principes bacillaires hydrosolubles, inertes eux-mêmes. Les travaux de MACHEBŒUF prouvent qu'une très faible fraction bien caractérisée des lipoïdes totaux est seule active, et que

(8) Machebœuf, G. Lévy, N. Fethke, J. Dieryck et A. Bonnefoi, *Ann. I. P.* (1934) **52**, 277 et **53**, 591, et (1935) **54**, 71 et **55** (sous presse). Voir aussi *C. R. Ac. Sc.* (1935), p.

(9) K. Meyer, *Zeit f. Immunit.*, **7** (1907); **9** (1911); **14** (1912).

(10) Dienes, *Journal Immunol.* **17**, 85 (1928).

(11) Heidelberger and Menzel, *Proc. soc. Exp. Biol. and Med.* **29**, 631 (1932); *Journ. Biol. Chem.* **104**, 654 (1934).

(12) Sandor et Ninni, en impression dans les *Annales de l'I. P.*

les autres fractions ne sont actives que lorsqu'elles sont impures et souillées par la fraction active. SANDOR et SCHAEFER arrivent enfin à concentrer l'activité fixatrice de l'alexine des polyosides dans une très faible fraction de ceux-ci, et la plus grande part devient pratiquement inerte. Tous ces faits confirment l'image d'après laquelle une très faible quantité de substances particulières constituerait le matériel antigénique des bacilles tuberculeux et vraisemblablement celui des autres cellules aussi, tandis que la grande masse des principes immédiats serait inerte, ou tout au moins, n'interviendrait pas dans l'activité antigénique des cellules vivantes.

MÉTHODES D'OBTENTION DES PROTÉIDES DU CORPS BACILLAIRE

Les bacilles tuberculeux (souche Bovine Vallée) ensemencés sur milieu synthétique de Sauton, sont récoltés après 4 à 6 semaines. Les bacilles vivants, jetés sur un papier filtre, sont lavés à l'eau distillée, déshydratés et tués par de l'alcool absolu à basse température (-5°), puis dégraissés par l'éther à froid (13). On les met ensuite à dessécher pendant plusieurs semaines dans le vide sulfurique. Les corps bacillaires sont alors broyés dans un mortier, avec du sable fin de Fontainebleau, délayés peu à peu avec une solution à 1 p. 100 de phosphate disodique, versés dans un flacon avec des billes de verre, en présence d'un cristal de thymol — puis soumis à l'agitation mécanique pendant 4 heures. On conserve à la glacière pendant 4 jours en agitant une fois par jour pendant une heure.

(13) L'enlèvement des lipoides par cette méthode n'est pas complet, mais il est suffisant pour ce qu'il nous occupe.

Le mélange est décanté et centrifugé. La solution protéidique est recueillie. Le magma demeuré dans le fond du ballon, et le culot des tubes à centrifuger sont lavés à deux reprises avec la solution de phosphate à 1 p. 100, en centrifugeant à chaque fois. Les eaux de lavage sont réunies à la solution mère.

Cette solution, encore trouble, est filtrée sur papier filtre ordinaire, puis sur filtre bactériologique. On obtient finalement un extrait protéidique bacillaire limpide, d'un beau jaune clair. Le pH pour l'une des préparations était de 7,53.

Nous avons déterminé la teneur en azote, en protéides vrais, en sucres simples et en polyosides, de cet extrait.

Le dosage d'azote total fut effectué suivant la méthode de KJELDAHL. Pour déterminer l'azote protéidique, nous avons ajouté à une portion aliquote de notre extrait, 1/5 de son volume d'acide trichloracétique à 40 p. 100; le précipité obtenu fut centrifugé. La teneur en azote de ce culot fut alors déterminée suivant la méthode de KJELDAHL.

Le dosage des sucres réducteurs (exprimés en glucose) fut effectué suivant la méthode de G. BERTRAND. L'hydrolyse des polyosides fut faite par $\text{SO}^4 \text{H}^2$ à 4 p. 100 à l'autoclave, à 120° pendant une heure.

Après avoir effectué ces différents dosages sur l'extrait primitif, nous avons soumis à la dialyse 20 cm³ de cet extrait.

Nous avons pour cela mis à dialyser sous pression, dans un sac en collodion 20 cm³ d'extrait protéidique bacillaire contre 40 cm³ d'eau distillée pendant 48 heures. Nous avons à ce moment mesuré le volume de

la solution restée dans le dialyseur. Il était de 11 cm³ 25. Nous avons fait un dosage d'azote sur 2 cm³ de cet extrait dialysé; un dosage de sucres réducteurs après hydrolyse, en rapportant les résultats trouvés à 1 cm³ de volume initial (14, v. p. suiv.).

Quelques-uns de nos résultats sont reproduits dans le tableau XIII.

TABLEAU XIII

Constitution chimique de l'extrait aqueux des bacilles avant et après dialyse

1° Réactions qualitatives :

Réaction de Molisch : très intense.

Réaction d'Adamkiewicz : positive, col. rougeâtre.

Réaction de Millon : col. rose.

Réaction du biuret : col. rose.

2° Déterminations quantitatives

PRÉPARATION N°	I av/dialyse mmgr.	II		
		av. dialyse	ap. dialyse	rapport ap. dialyse av. dialyse p. 100
Azote total.....	5.51	2.84	1.3	26
Azote protéidique.....	0.912	0.75	—	
Sucres réducteurs avant hydrolyse.....	2.2	—	—	
Sucres réducteurs après hydrolyse.....	16.36	13.36	2.98	22

Les chiffres sont exprimés en milligr. et rapportés à 1 gr.
de corps bacillaires secs.

Nos résultats confirment ceux obtenus par SANDOR et PEREZ. En particulier, nous trouvons que les protéides vrais ne constituent qu'une faible proportion des substances azotées ($1/6$ à peu près dans l'exemple choisi). Les sucres, par contre, se trouvent en majeure partie sous la forme de sucres complexes, hydrolysables ($7/8$ sensiblement). L'azote non protéidique se trouve sous une forme facilement diffusible. En effet, après 48 heures de dialyse, 74 p. 100 de l'azote total non protéidique a traversé les dialyseurs, alors que 78 p. 100 des sucres ont dialysé.

Ultérieurement d'ailleurs, nous allons voir que, par une dialyse plus énergique (contre l'eau courante) la majeure partie des substances azotées s'élimine quand même, et on obtient finalement un extrait qui contient au moins autant de polysides que de protéides (tableau XIV).

Le rendement total de l'extraction est relativement faible : 3,50 p. 100 des corps bacillaires à peu près pour les substances azotées. Il est du même ordre de grandeur que celui trouvé par SANDOR et PEREZ (2, 6 à 5,4 p. 100).

COMPOSITION CHIMIQUE

Nous avons déterminé la teneur en azote, en oses, en phosphore, en substances lipoidiques, et en cendres, de nos extraits de protéides bacillaires dialysés et deséchés. Certaines méthodes employées ont déjà été

(14) Comme nous n'avons pas renouvelé l'eau de dialyse, les résultats donnés ici ne peuvent pas être étendus à ce qui se passerait si la dialyse était poursuivie jusqu'à élimination complète des substances dialysables.

décrites ci-dessus (azote — oses). Nous avons trouvé une constitution variable de nos poudres, en protéides (15 à 52 p. 100), et en polysides.

Préparation n°	III	IV	V	V bis
Azote p. 100	5,35			
	7,37	7,45	2,3	2,07
Sucres réducteurs				
après hydrolyse	48	32,48		
exprimés en glucose, p. 100	32,3	32,3	70,75	

Le dosage de phosphore fut effectué suivant la méthode de MACHEBŒUF (15). Nous avons trouvé pour deux préparations 2.64 et 2.56 p. 100 de phosphore.

Pour déterminer l'extrait lipoidique, nous avons épuisé une fraction aliquote de notre poudre par l'alcool chaud, le benzène, puis l'éther. Les extraits furent évaporés à sec, repris par l'éther et le benzène anhydres, filtrés et amenés enfin à dessiccation dans le vide, dans une fiole tarée. La teneur en substances lipoidiques est faible (5.2 p. 100) et se rapproche de celle trouvée pour les protéides tuberculiniques (6 p. 100).

Nous avons trouvé une teneur en cendres variant de 3,6 à 6,8 p. 100 avec les préparations.

DÉTERMINATION DU POUVOIR HAPTÈNE

Nous avons déterminé l'activité fixatrice de nos différentes préparations de protéides bacillaires, en présence d'un sérum de cheval anti B. C. G. (sérum du

(15) M. A. Machebœuf, *Bull. Soc. Chim. Biol.* (1926) 7, 464.

cheval 65 ayant reçu plusieurs injections de bacilles B. C. G. vivants). Nos expériences se sont déroulées suivant le protocole expérimental décrit page 46. Les résultats sont réunis dans le tableau XV.

TABLEAU XV

*Activité fixatrice des protéides bacillaires
en présence de sérum de cheval anti B. C. G.*

PRÉPARATION N°	I	II	IV	V	V bis
	mmgr.				
Activité fixatrice en présence du sérum de cheval anti B. C. G.	1/160	1/400	1/800	1/800	1/80

Toutes nos préparations possèdent une activité fixatrice quelquefois très importante, puisque par exemple la préparation IV fixait 2 unités 1/2 d'alexine pour 1/800 mg.

Nous avons déterminé l'activité fixatrice de l'alexine de l'extrait lipoidique de nos protéides. Le plus petit poids de cet extrait fixant encore 2 unités 1/2 d'alexine était le 1/80 mg. (pour notre préparation II). Ainsi la forte activité fixatrice des protéides ne provient pas de la présence de cette petite fraction (5.2 p. 100) de substances lipoidiques.

ACTIVITÉ ANTIGÉNIQUE

Nous avons préparé nos animaux suivant notre technique habituelle en injectant en tout, à chacun, 60 mg. protéides bacillaires. Nous avons titré la richesse en

anticorps des immusérums obtenus. Ils furent tous très actifs. Nous résumons nos résultats dans le tableau XVI.

TABLEAU XVI

*Pouvoir antigénique des protéides bacillaires
en présence de leurs antisérums homologues*

PRÉPARATION N ^o	II	III	V	V bis
Unités d'alexine	100	400	100	
fixées par 1cm ³	100	100	200	800
d'antisérum homologue		100		

Nous rappellerons ici, en les opposant, les résultats obtenus avec les protéides tuberculiniques qui furent inactifs dans la moitié des cas, alors que toutes nos préparations de protéides bacillaires sont douées d'activité antigénique.

ACTION DE LA CHALEUR SUR L'ACTIVITÉ ANTIGÉNIQUE DES PROTÉIDES DU CORPS BACILLAIRE

Nous n'avons pas, sur les protéides du corps bacillaire, vérifié toutes les expériences effectuées sur les protéides tuberculiniques pour étudier l'influence de différents facteurs physico-chimiques. Nous avons tenu, cependant, à vérifier l'influence de la chaleur.

Nous avons pesé un certain poids de protéides des corps bacillaires, à partir de la préparation V bis. Nous les avons remis en solution dans l'eau distillée et soumis à l'action de l'autoclave à 120° pendant 20 minutes comme nous avons opéré pour les protéides tuberculiniques. Après élimination par centrifugation de la frac-

tion coagulée, la solution protéidique fut mise à dessécher dans le vide sulfurique. Nous l'avons conservée ainsi, et reprise par l'eau distillée pour la dissoudre au moment de nos expériences.

Nous avons parallèlement inoculé à des animaux la fraction primitive et la fraction chauffée, selon le mode habituel.

Après récolte des sérums, nous avons déterminé d'une part, l'activité fixatrice de nos deux fractions, en présence du sérum de cheval anti B. C. G. et de nos immunosérums et d'autre part, leur activité antigénique *in vivo*.

TABLEAU XVII

Activité fixatrice et antigénique de protéides bacillaires bruts et de leur fraction chauffée

PRÉPARATION N° V bis	Activité fixatrice en présence du sérum			Unités d'alexine fixées par 1cm ³ du sérum	
	Anti B. C. G.	Anti-protéides bacillaires primitifs	Anti protéides bacillaires chauffés	Anti-protéides bacillaires primitifs	Anti-protéides bacillaires chauffés
Protéides primitifs....	1/80	1/40	1/10	600	1000
Protéides chauffés....	1/40	1/4	1/4	1200	800

Comme pour les protéides tuberculiques, la chaleur a sensiblement diminué l'activité haptène fixatrice du protéide bacillaire; elle est également restée sans effet sur l'activité antigénique proprement dite — mais ici, contrairement à ce qui s'est produit avec nos fractions de protéides tuberculiques, elle ne paraît pas avoir altéré la spécificité antigénique.

FRACTIONNEMENT DES PROTÉIDES TUBERCULINIQUES
ET DES PROTÉIDES DU CORPS BACILLAIRE.

ACTIVITÉ FIXATRICE DES FRACTIONS
EN PRÉSENCE DU SÉRUM DE CHEVAL ANTI B. C. G.

Les protéides tuberculiniques bruts, comme l'extrait obtenu à partir des corps bacillaires, sont constitués par un mélange de protéides et de polysides. Nous avons cherché, en présence de sérums antibacillaires (sérum anti B. C. G.) si, dans ce mélange, l'haptène est le polyside ou le protéide proprement dit. Pour séparer les protéides des polysides, nous avons adopté deux méthodes différentes pour les extraits obtenus à partir des corps bacillaires, et les protéides tuberculiniques.

FRACTIONNEMENT DES EXTRAITS OBTENUS
À PARTIR DES CORPS BACILLAIRES

Ces extraits contiennent, à côté des protéides vrais, des substances azotées moins complexes qui ne précipitent pas par l'acide trichloracétique. Ce réactif précipitant ne permet donc pas de séparer quantitativement les protéides des polysides. Nous avons employé l'acide phosphotungstique en présence d'acide sulfurique dilué qui permet cette séparation.

Nous mesurons le volume de notre extrait de protéides du corps bacillaire, après la filtration. Nous pesons 3 p. 100 de son poids d'acide phosphotungstique, qui est broyé dans un mortier avec un peu d'eau et ajouté à la solution protéidique; on additionne d'acide sulfurique pur, de telle sorte que l'on soit en présence d'acide sulfurique N/2. On centrifuge aussitôt.

Le liquide décanté est mis à part (A).

Le culot est repris par de l'acide sulfurique N/5, et centrifugé; l'opération est répétée, en réunissant les eaux de lavage sulfuriques qui sont conservées. Le culot est repris alors par de l'eau de baryte saturée, ajoutée goutte à goutte, jusqu'à réaction alcaline. On précipite ainsi du sulfate de Ba, et du phosphotungstate de Ba; on triture pendant une demi-heure et on jette sur un filtre. Dans le filtrat, l'excès de baryte est éliminé par l'acide sulfurique dilué, versé goutte à goutte jusqu'à virage du tournesol au rouge vineux. Le précipité de sulfate de baryum est éliminé par filtration. Le filtrat est mis à dessécher dans le vide sulfurique. On le recueille sous forme de poudre composée de protéides et de protéoses.

Les eaux de lavage sulfuriques sont mesurées. On leur ajoute 3 fois leur volume d'alcool absolu, et 1 volume d'éther sulfurique. Un précipité blanc apparaît — qui est recueilli par centrifugation, puis remis en solution dans l'eau distillée — on précipite de nouveau par le mélange alcool-éther. Le précipité formé est recueilli, lavé par deux fois à l'éther, en centrifugeant, puis mis à dessécher dans le vide sulfurique. Il a l'aspect d'une poudre blanche, exempte d'azote, donnant par l'hydrolyse acide 92 p. 100 de sucres réducteurs exprimés en glucose. Le liquide de décantation (A) est additionné de baryte que l'on ajoute peu à peu en appréciant l'acidité du milieu, jusqu'à atteinte de la coloration verdâtre du papier au bleu de bromothymol. Il s'est produit un abondant précipité de sulfate de baryum — on filtre jusqu'à obtention d'un liquide clair. Celui-ci est concentré par distillation dans le vide, à basse température, jusqu'à un volume restreint. Après lecture de ce volume,

on ajoute 5 volumes d'alcool absolu, un précipité blanc apparaît; après 20 heures de contact, il est centrifugé.

Le culot est lavé à l'alcool, puis 3 fois à l'éther — finalement, amené à dessiccation dans le vide sulfurique.

ACTIVITÉ FIXATRICE
DES PROTÉIDES ET DES POLYOSIDES
DU CORPS BACILLAIRE
EN PRÉSENCE DU SÉRUM DE CHEVAL ANTI B. C. G.

Nous avons ainsi obtenu trois fractions : le précipité phosphotungstique, constitué par les protéides et les protéoses, les eaux de lavage acides de ce précipité, qui contiennent des polyosides, et les eaux-mères de ce même précipité qui en contiennent aussi.

Dans les essais sérologiques effectués avec ces fractions en présence du sérum de cheval anti B. C. G., les résultats montrent que l'haptène bacillaire proprement dit est plus particulièrement associé avec les fractions polyosidiques.

		Activité haptène en mmg.
Préparation n° IV	Précipité phosphotungstique .	0
	Fraction polyosidique	1/160
Préparation n° V	Précipité phosphotungstique .	0
	Eaux de lavage acides	1/80
	Fraction polyosidique	0

Un fait curieux apparaît dans le cas de la préparation V. L'activité fixatrice s'est concentrée en totalité dans la fraction polyosidique qui est adsorbée par le précipité phosphotungstique, et que nous éluons par l'acide sulfurique dilué. Nous avons vu que cette fraction est à peu près uniquement constituée par des polyo-

sides. Le fait que l'activité fixatrice de l'alexine se concentre dans cette fraction paraît prouver la grande adsorbabilité de l'haptène proprement dit.

ACTIVITÉ FIXATRICE

DES PROTÉIDES ET DES POLYOSIDES TUBERCULINIQUES
EN PRÉSENCE DU SÉRUM DE CHEVAL ANTI B. C. G.

La méthode de fractionnement fut décrite dans le chapitre précédent. Nous avons donc utilisé l'acide trichloracétique puisqu'il s'agissait d'une préparation dialysée qui ne contenait plus comme substances azotées que des protéides précipitables par cet acide. Les résultats sérologiques sont reproduits dans le tableau XVIII. L'activité fixatrice de l'alexine se concentre encore plus particulièrement dans les polyosides.

TABEAU XVIII

*Activité fixatrice
en présence du sérum de cheval anti B. C. G.
des protéides et des polyosides obtenus
à partir des protéides bruts*

PRÉPARATION N ^o	Activité fixatrice en présence de sérum anti B. C. G. des	
	protéides purifiés	polyosides
IV	1/4	1/120
V	1/8	1/120
XVIII	1/80	1/320

Il est ainsi probable que l'haptène de nos extraits aqueux des bacilles est dans la fraction polyosidique. Nous avons tenu encore à préciser deux points importants :

a) l'activité de l'extrait lipoidique, dit « antigène méthylique » de Boquet et Nègre, en présence des sérums obtenus par l'injection de nos fractions protéidiques.

b) les différences de spécificité sérologique qui peuvent éventuellement exister entre les protéides bruts tuberculiniques et ceux du corps bacillaire.

ACTIVITÉ FIXATRICE DE L'EXTRAIT MÉTHYLIQUE DE BOQUET ET NÈGRE

EN PRÉSENCE DES ANTI-SÉRUMS OBTENUS
EN INJECTANT NOS FRACTIONS PROTÉIDIQUES

Nous avons vu que les protéides bruts extraits du corps bacillaire contiennent de l'haptène lipoidique. SCHAEFER et SANDOR (16) ont montré qu'il en est de même pour les protéides tuberculiniques. Cependant les sérums anti-protéidiques, qu'ils soient obtenus par l'injection des protéides du milieu de culture, ou des protéides du corps bacillaire, ne réagissent jamais avec l'extrait méthylique de Boquet et Nègre. SCHAEFER et SANDOR ont montré, de plus, que les protéides tuberculiniques ne réagissent pas en présence des sérums obtenus par l'injection des mélanges des substances lipoidiques du corps bacillaire. Il existe donc une démarcation nette entre l'haptène de type lipoidique et celui de type polyosidique.

(16) Schaefer et Sandor, *Ann. Inst. Past.* 53, 72 (1934).

RÉACTIONS CROISÉES ENTRE LES PROTÉIDES
DU MILIEU DE CULTURE ET CEUX
DU CORPS BACILLAIRE

Il fut établi que, dans le cas de nos extraits protéidiques bruts, les fractions polyosidiques constituaient toujours les haptènes principaux ou uniques, en présence de sérums obtenus par l'injection de bacilles B. C. G. vivants. Il s'agissait de voir s'il existe une différence de spécificité entre l'haptène protéido-polyosidique du corps bacillaire, et celui du milieu de culture.

Nous avons donc comparé l'activité sérologique des protéides bruts du corps bacillaire, en présence de l'anti-sérum obtenu par l'injection de protéides tuberculiniques, à celle des protéides tuberculiniques en présence de l'anti-sérum « protéides bacillaires ». Nous résumons dans le tableau XIX les résultats obtenus.

Avant de conclure définitivement, il faudrait encore faire des essais de saturation des anti-corps; cependant nous pouvons dire déjà qu'il n'y a pas de différences sérologiques entre les protéides des corps bacillaires et ceux du milieu de culture. En effet, les deux sortes de protéides réagissent également en présence de leur anti-sérum homologue, ou de l'anti-sérum appartenant à l'autre groupe. Ainsi il devient vraisemblable qu'un même haptène protéido-polyosidique existe dans nos extraits aqueux des bacilles comme dans le milieu de culture.

TABLEAU XIX

*Spécificité des protéides tuberculiniques et bacillaires,
en présence de sérums
anti-protéides « tuberculiniques »
et anti-protéides du « corps bacillaire »*

	Sérums anti-protéides bacillaires totaux		Sérums anti-protéides tuberculiniques bruts	
	in vitro	in vivo	in vitro	in vivo
Proteides bacillaires n° V	antiser. n° V 1/160	250	antiser. n°	
n° V bis	V 1/80 V bis $\frac{1}{80} \frac{1}{40}$	500 800	XVIII 1/20 XIX	200 200
Proteides tuberculiniques nos XIII, XIV, XVIII, XIX	antiserum n° V $\frac{1}{20} \frac{1}{20} \frac{1}{40} \frac{1}{4}$	200, —, 200, 100	antiserum n° XIII 1/40 XVI 0 XVIII $\frac{1}{320}$	100 0 200
XIII, XVI, XVIII, XIX	antiserum n° V bis $\frac{1}{240} \frac{1}{80} \frac{1}{320} \frac{1}{4}$	800, 100 800, 200	XIX	10

1^{re} colonne : activité fixatrice — poids minimum d'antigène fixant encore
2 1/2 unités d'alexine, exprimé en mmgr.

2^e colonne : pouvoir antigénique in vivo — unités d'alexine fixées par
1cm³ d'antiserum.

RÉSUMÉ

Nous avons décrit une méthode qui permet d'obtenir, à partir des corps bacillaires, des extraits contenant des protéïdes qui semblent non dénaturés. A côté des protéïdes, ces extraits contiennent une grande quantité de substances azotées plus simples, capables de dialyser lentement (protéïoses, ou protéïdes peu complexes). Ces dernières substances sont inertes du point de vue antigénique.

Les protéïdes du corps bacillaire possèdent une activité considérable, et tout à fait constante. Leur activité fixatrice en présence du sérum de cheval anti B. C. G. est fort élevée.

L'activité antigénique des protéïdes des corps bacillaires résiste au chauffage à l'autoclave à 120°, sans subir aucune modification apparente.

Les protéïdes du corps bacillaire, comme ceux du milieu de culture, contiennent des haptènes lipoidiques; mais ce n'est pas à cette impureté qu'ils doivent leur activité fixatrice de l'alexine. Celle-ci dépend des polysides, et les protéïdes proprement dits ne jouent pas un rôle important (tout au moins en présence du sérum de cheval anti B. C. G.).

Il n'y a pas de différence de spécificité entre les protéïdes du milieu de culture, et ceux du corps bacillaire, et il est possible que les protéïdes actifs comme antigènes que l'on trouve très irrégulièrement dans le milieu de culture soient simplement des protéïdes des corps bacillaires diffusés dans le milieu par suite de la mort ou de la souffrance de certains bacilles pendant la culture.

Cette mort, ou cette simple souffrance, pourrait dépendre, par exemple, de la plus ou moins bonne tenue en surface, du voile de culture, ou de bien d'autres facteurs tels que les variations du pH, ou de l'aération du milieu. On comprendrait ainsi que dans certains cas, la culture ayant parfaitement évolué, nous ne trouvions pas, en quantité décelable dans le milieu de culture, des protéides actifs comme antigènes de fixation de l'alexine; seuls y seraient alors présents les protéides d'excrétion des bacilles, actifs seulement comme tuberculines. Dans les cas où les cultures auraient un peu moins bien évolué (voiles tenant mal en surface, variations de pH, ou autre facteur), les mauvaises conditions de vie ou la mort d'une certaine proportion des bacilles auraient laissé diffuser dans le milieu une partie des protéides normalement inclus dans les bacilles.

Cette hypothèse mérite vérification; nous poursuivons ces recherches, car il serait extrêmement intéressant de pouvoir prouver que les protéides tuberculiniques sont bien dépourvus de toute activité antigénique de fixation de l'alexine.

CHAPITRE IV

Discussion théorique sur la nature de l'activité antigénique

ASPECT BIOLOGIQUE DU PROBLÈME

Que l'introduction parentérale d'une substance étrangère provoque ou non la formation d'anticorps, cela dépend tout d'abord d'une propriété particulière de l'organisme producteur d'anticorps. Pour employer les termes d'ERLICH, la substance étrangère doit pouvoir provoquer un « ictus immunisatorius », une irritation immunisante. Les cellules productrices d'anticorps possèdent donc un pouvoir de discernement. C'est grâce à ce discernement que parmi les substances étrangères avec lesquelles ces cellules peuvent entrer en contact, certaines seulement provoquent l'apparition d'anticorps. Nous ignorons tout de ce pouvoir de discernement, mais il est très vraisemblable qu'il dépende d'une structure physico-chimique propre aux cellules. Il ne nous est pas permis, avec les méthodes actuelles, d'étudier directement cette structure.

SON ASPECT PHYSICO-CHIMIQUE
CONSTITUTION PHYSICO-CHIMIQUE
DES ANTIGÈNES EN GÉNÉRAL
SUBSTANCE ACTIVE ET SUPPORT COLLOIDAL

L'étude de la constitution physico-chimique des antigènes est celle qui peut être poursuivie d'une façon relativement facile, et les résultats de cette étude nous apportent des faits précis.

Dans sa théorie, ERLICH admet qu'un antigène doit posséder un groupement haptophore qui, au cours de l'immunisation, s'unit aux récepteurs cellulaires. D'autres parties de la théorie d'ERLICH peuvent être fausses, en particulier la préformation des récepteurs cellulaires n'existe pas, puisque LANDSTEINER (1) a montré que l'introduction de groupements artificiels quelconques dans un antigène, détermine l'apparition d'anticorps spécifiques pour ces groupements. Par contre il vérifie en même temps et démontre expérimentalement la première partie de l'hypothèse d'ERLICH, à savoir l'existence d'un groupement fixateur actif, d'un groupement haptophore, dans les antigènes. Les recherches ultérieures (1 à 5) confirmèrent entièrement ces résultats.

LANDSTEINER (6) montra également, avec l'antigène hétérogénétique de FORSSMANN, qu'un antigène cellulaire non modifié, est constitué d'une fraction active

(1) Landsteiner et Lampl., *Biochem. Zeit.* 86, 343 (1918).

(2) Pick et Obermayer, *Wien. Klin. Woch.* (1903), 22 1904, 10 (1906), 12.

(3) Landsteiner, *Biochem. Zeit.* 104, 280 (1920).

(4) Landsteiner and van der Scheer, *Journ. Exp. Med.* 56, 399 (1932).

(5) Landsteiner, *Biochem. Zeit.* 119, 294 (1921).

(6) Landsteiner and Simms, *Journ. Exp. Med.* 38, 127 (1923).

(haptène), réagissant isolément avec les anticorps, et d'un support protéidique n'intervenant pas dans les réactions sérologiques. Par la suite, ces faits furent aussi confirmés pour un grand nombre d'autres antigènes cellulaires (antigène ubiquitaire (7), polyosides du pneumocoque (8) etc...). A ces substances actives, isolées, qui contiennent le groupement haptophore, LANDSTEINER (9) donna le nom d' « haptènes ».

A ces premiers faits expérimentaux, s'ajoute un deuxième fait physico-chimique important, qui paraît être général, à savoir : la nécessité d'une constitution complexe de l'antigène.

Les substances actives relativement simples telles que les haptènes lipoïdiques ou polyosidiques, n'engendrent généralement pas d'anticorps, et ne deviennent actives que lorsqu'elles sont associées à un support colloïdal. Par analogie, nous pouvons admettre, comme SANDRO (10), que les antigènes protéidiques sont aussi constitués par une substance active liée à un support colloïdal. Cette analogie est d'autant plus légitime que les protéïdes se sont toujours montrés constitués par plusieurs espèces chimiques, unies par des valences secondaires (11).

Les antigènes complets ressemblent ainsi beaucoup aux diastases qui, elles aussi, semblent constituées par une partie active qui ne pourrait agir que lorsqu'elle est supportée par des colloïdes biologiques complexes.

(7) Sachs, *Deut. Med Woch.* 15, 589 (1925).

(8) Zozaya and Clark, *Journ. Exp. Med.* 57, 21 (1933).

(9) Landsteiner, *Biochem. Zeit.* 119, 294 (1921).

(10) Sandor, *Contribution à l'étude des antigènes des microbes pathogènes*, Doin Paris, 1935.

(11) Soerensen, *C. R. Lab. Carlsberg*, VI, 18 (1930). G. Sandor, *Le problème des protéïdes*, Doin, Paris, 1934.

Un antigène complet étant constitué d'une substance active, et d'un support colloïdal, pour élucider le problème de la nature des antigènes, il faut donc étudier : les relations entre le support et la substance active, la nature et le rôle des supports, la nature et le rôle des substances actives.

RELATIONS ENTRE SUBSTANCE ACTIVE ET SUPPORT

La substance active ne doit pas être nécessairement combinée d'une façon chimique à son support, mais en tout cas, elle doit être fixée par ce dernier. En effet, l'activation des haptènes ne réussit, en général, que s'ils sont mélangés avant l'injection avec le support colloïdal, et des injections séparées de haptènes et de supports colloïdaux, ne produisent pas d'anticorps. Cependant il y a des exceptions — ainsi on a constaté parfois que certains haptènes peuvent être activés par l'injection simultanée de substances irritantes, lorsque la voie d'introduction est sous-cutanée. De telles activations nous montrent que le support peut intervenir au moins partiellement, par une diminution de la diffusibilité des haptènes, comme dans le cas d'une exagération de la réaction inflammatoire qui aboutit à un blocus des vaisseaux efférents (12).

NATURE ET RÔLE DU SUPPORT

La nature et le rôle du support ont été l'objet de très nombreuses recherches dont les résultats ont été résumés dans un chapitre précédent. Ces recherches semblent démontrer que non seulement des protéides naturels, mais aussi des colloïdes absolument inertes

(12) Valy and Menkin, *J. Exp. Med.* **53**, 171 (1931).

comme le kaolin, l'alumine, le noir animal ou le colloïdion peuvent activer des haptènes. La nature du support colloïdal ne paraît donc pas jouer un rôle fondamental dans l'activité antigénique. Ce fait semble être en faveur d'une théorie relativement ancienne de H. SACHS (13). D'après cette théorie, le support jouerait simplement le rôle d'un entraîneur, il engloberait l'haptène et éviterait ainsi que celui-ci ne soit fixé par les protéides humoraux de l'animal inoculé avant qu'il n'entre en contact avec les cellules productrices d'anticorps.

Mais cette théorie n'explique pas les différences spécifiques observées dans le pouvoir activant des différents supports vis-à-vis d'un même haptène : parmi les protéides naturels, qui sont les meilleurs supports, et qui doivent être étrangers à l'espèce productrice d'anticorps, certains, en effet, conviennent mieux que d'autres. Ainsi, l'activation de l'antigène de FORSSMANN réussit mieux chez le lapin avec le sérum de porc qu'avec le sérum de cheval ou d'homme (14).

Les globules rouges sont sans action tandis que les cellules microbiennes activent fortement cet antigène de FORSSMANN (15). Parmi les adsorbants inertes, également, certains sont plus aptes que d'autres (16).

Par contre, la théorie de DOERR et HALLAUER (17) permet d'expliquer une influence spécifique de la part du support. Ces auteurs supposent qu'un haptène, pour posséder une influence antigénique, doit pouvoir entrer en contact intime avec les cellules productrices d'anti-

(13) H. Sachs, *Deutsch. med. Woch.* 15, 589 (1925).

(14) Doerr et Hallauer, *Zeit. f. Immunität* 47, 291 (1925).

(15) Doerr et Hallauer, *Zeit. f. Immunität* 45, 170 (1925).

(16) Jacobs, *Journ. Exp. Med.* 59, 479 (1934).

(17) Doerr et Hallauer, *Zeit. f. Immunität* 45, 170 (1925).

corps, éventuellement même pénétrer à l'intérieur de ces cellules. Le support doit donc assurer une dispersion convenable de l'haptène, et l'influence dispersante est variable d'un support au suivant. Mais, si cette théorie peut s'appliquer aux haptènes lipoïdiques, elle ne tient pas compte des polysides qui, étant hydrosolubles, sont dispersés sans aucun substrat. La théorie n'explique d'ailleurs pas la nature et le rôle joué par les substances actives dans l'activité antigénique.

NATURE ET RÔLE DES SUBSTANCES ACTIVES

La nature particulière des substances actives est vraisemblablement l'un des caractères fondamentaux des antigènes. Pour certains haptènes actifs, on a constaté un faible pouvoir antigénique, sans union avec des supports colloïdaux. (K. MEYER (18), SCHIEMANN (19), ZOZAYA (20), AVERY (21), BOQUET et NÈGRE (22) etc...). On a beaucoup discuté pour savoir si cette activité antigénique faible et inconstante n'est pas due à des impuretés protéïdiques accidentelles (LANDSTEINER), ou à des infections microbiennes (DOERR et HALLAUER), mais ces expériences contradictoires ne sont pas très convaincantes. Il est probable que tous les haptènes possèdent un caractère physico-chimique particulier qui fait que ce sont des antigènes en puissance — activables par des substances complexes appropriées. D'ailleurs lorsqu'on fractionne une préparation contenant un haptène, souvent les fractions n'ont plus le pou-

(18) K Meyer, *Zeit. f. Immunität* 15, 245 (1912).

(19) Schiemann, *Zeit. f. Hyg. et Inf.* 108, 220 (1927).

(20) Zozaya, *Journ. Exp. Med.* 57, 38 (1933).

(21) Avery and Goebel, *Journ. Exp. Med.* 58, 731 (1933).

(22) Boquet et Nègre, *Ann. Inst. Pasteur* 37 (1923).

voir d'être activables par les adsorbants inertes. Ce phénomène fut constaté pour les polyosides par ZOZAYA (23), et pour l'antigène de FORSSMANN par JACOBS (24). Il est donc possible que nous n'ayons pas encore créé une activité antigénique de toutes pièces, mais que nous ayons activé une activité antigénique très faible préexistante. LANDSTEINER (25).

Un fait important du point de vue théorique est que l'haptène paraît pouvoir produire des anticorps chez l'espèce dont il provient lorsqu'il est associé à des protéides étrangers. SACHS et d'autres auteurs (a) ont montré que l'extrait alcoolique des organes de lapin associé au sérum de porc, produit des anticorps chez le lapin.

Faisons toutefois remarquer que les divers traitements appliqués par ces auteurs à leurs extraits lipoidiques ont pu modifier profondément les principes immédiats (oxydation, alcoololyse, etc...). Il se peut ainsi qu'une nouvelle spécificité se soit créée.

Ces réserves formulées, ces faits semblent prouver que les spécificités biologiques sont d'ordre physico-chimique puisque dans ce cas, les substances lipoidiques propres ont changé de caractère par simple association avec des protéides étrangers.

(23) Zozaya, Journ. Exp. Med. 57, 38 (1933).

(24) Jacobs, Journ. Exp. Med. 59, 479 (1934).

(25) Landsteiner et Jacobs, Proc. Soc. Exp. Biol. et Med. 29, 570 (1932).

(a) Ces auteurs expliquent la réaction de Wassermann, en admettant qu'elle est due à des anticorps engendrés par les substances lipoidiques propres à l'organisme syphilitique, associées à des protéides des spirochètes.

STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE
DES COLLOÏDES BIOLOGIQUES
ET ACTIVITÉ ANTIGÉNIQUE

Dans tout ce qui précède, nous avons vu l'importance primordiale des substances complexes d'origine biologique dans l'activité antigénique. La science attend encore la découverte d'un antigène synthétique proprement dit, et c'est encore la voie analytique qui doit être suivie pour découvrir les qualités particulières des antigènes naturels qui déterminent leur activité antigénique. C'est cette voie que nous avons suivie dans nos recherches.

Nous avons étudié les conditions de disparition de l'activité antigénique d'une préparation de protéides microbiens, protéides du milieu de culture des bacilles tuberculeux. Nous avons trouvé dans le cas où ces protéides possédaient une activité antigénique, que celle-ci résistait énergiquement aux différentes actions physico-chimiques qui lui étaient appliquées. En opposition avec cette stabilité, nous avons noté l'inconstance de l'activité de nos préparations de protéides du milieu de culture — (une fois sur deux à peu près). Nous n'avons pas pu trouver les raisons de cette variabilité; il n'est pas impossible qu'elle dépende de l'influence des sels neutres à forte concentration, que nous avons employés dans la préparation de notre protéide, bien que nous ayons tout fait pour rendre constantes nos conditions de travail.

Nous avons été conduit à émettre cette hypothèse, en observant l'influence dénaturante des sels neutres sur certaines fractions de nos préparations protéidiques, dé-

naturation conduisant à l'insolubilisation d'une partie de nos protéïdes.

Les expériences d'ultra-centrifugation de SVEDBERG (26) sur les globulines sériques, ont d'ailleurs prouvé que les sels neutres à concentration élevée peuvent modifier d'une façon irréversible la structure des protéïdes.

Si donc, l'activité antigénique résiste fortement à certaines influences, chaleur, alcool, etc..., elle peut, par contre, être détruite par d'autres influences, même moins violentes, dont nous ne sommes pas encore maîtres. Il est possible qu'aucun changement chimique proprement dit n'accompagne cette disparition d'activité, et il peut s'agir d'une modification d'ordre physique, intéressant la structure physico-chimique des protéïdes. Nous sommes ainsi conduit à prévoir l'étude du rôle que peut jouer celle-ci dans l'activité antigénique.

Diverses constatations plaident en faveur de cette hypothèse. En effet, les raisons purement chimiques du rôle antigénique des protéïdes sont obscures, et si, à un moment donné, on a pensé que l'existence de certains acides aminés (aromatiques ou sulfhydrilés) pouvait déterminer cette activité, il est démontré actuellement qu'il n'en est rien.

D'autre part, les protéïdes possèdent une structure physique particulière et certains protéïdes peuvent perdre leur activité antigénique parallèlement avec la disparition de cette structure physique. Il en est ainsi pour les collagènes qui, en se transformant en gélatine sous l'in-

(26) Svedberg et Sjögren, *Journ. Amer. Chem. Soc.* 50, 3318 (1928); 52, 2855 (1930).

fluence du chauffage, perdent leur structure micro-cristalline (27) et leur activité antigénique.

Le rôle très important joué par les protéides dans l'activité antigénique dépend donc vraisemblablement d'une structure physico-chimique particulière.

Nous ne connaissons pas encore le mécanisme d'action de cette structure; il est fort probable qu'elle intervient dans la partie purement biologique de la production des anticorps, qui dépend d'un pouvoir de discernement des cellules. Elle peut jouer aussi un rôle purement mécanique en assurant non seulement une dispersion, mais aussi une orientation convenable de la substance active.

Dans la production des anticorps, la première phase est vraisemblablement une adsorption de l'antigène par les cellules productrices des anticorps. Le support colloïdal des substances antigéniques actives favorise cette adsorption par trois moyens différents : a) en diminuant la diffusibilité, donc la vitesse d'élimination des antigènes; b) en évitant, comme le pense SACHS, l'adsorption de l'antigène par les colloïdes humoraux, et c) en polarisant le groupement actif d'une façon convenable pour que la fixation par les cellules puisse se faire.

La grande diffusibilité de la substance active (28) permet cet accolement, mais celui-ci n'aboutit pas toujours à la production d'anticorps. L'organisme producteur d'anticorps a un pouvoir de discernement fondé lui-même certainement sur un caractère physico-chimique qui nous échappe. Certaines particularités physico-chimiques modifieraient la configuration des colloïdes humo-

(27) Gerngross, Hermann und Abitz, *Biochem. Zeitschr.*, **228**, 409 (1930).

raux qui deviendraient ainsi des anticorps. Ces particularités résultent du caractère de support colloïdal, comme de celui de la substance active. Etant donné que l'anticorps formé est dirigé spécifiquement contre la substance active, nous devons admettre que les relations spaciales entre substance active et support ont joué un rôle dans la production de l'anticorps, donc, d'une façon globale, la substance active a subi une orientation, une polarisation de la part de son support.

Dans ce qui précède, nous étions amené à considérer le mécanisme de la production des anticorps, et nous avons adopté un point de vue purement physique. L'influence des antigènes sur les cellules productrices d'anticorps ressemblerait, dans une première phase, à une teinture. Les cellules ainsi teintées par l'antigène ne secrèteraient plus des substances humorales normales, mais des substances présentant dans leur constitution une certaine empreinte (ou un certain moulage) due aux antigènes adsorbés par la cellule. Ces substances ainsi impressionnées par les antigènes seraient les anticorps.

Les termes d'empreinte et de moulage que nous venons d'utiliser ne doivent être entendus que comme des termes de comparaisons très grossières; l'arrangement spatial des protéides secrétés par les cellules productrices d'anticorps pourrait cependant être justement ce que la présence des antigènes peut modifier.

Le pouvoir de discernement des cellules serait alors simplement une possibilité de teinture ou mieux encore une possibilité de sécréter des substances adsorbées du type envisagé.

Ces hypothèses de travail sont encore sans fondement précis; nous les avons surtout formulées pour chercher une voie d'accès à nos études ultérieures sur la physico-chimie de l'immunité.

Conclusions

A partir du milieu de culture séparé des Bacilles tuberculeux, nous avons obtenu, par précipitation par les sels neutres, des complexes protéidiques (appelés aussi protéides tuberculiniques). Nous avons également préparé des extraits protéidiques en partant des corps bacillaires dégraissés et desséchés. Tous ces protéides bruts contiennent des polyosides et de faibles quantités de substances lipoïdiques.

Nous avons étudié l'activité antigénique de ces deux préparations, à savoir les protéides du milieu de culture, et les protéides du corps bacillaire.

Les protéides du milieu de culture sont inactifs une fois sur deux environ. Nous n'avons pas pu rattacher cette inconstance à l'influence de l'un des différents facteurs étudiés. Par contre, lorsque les préparations sont antigéniques, cette activité n'est pas détruite par les divers agents physico-chimiques essayés (dessiccation, chaleur, acide trichloracétique, alcool).

L'alcool ne modifie pas la spécificité antigénique de ces protéides, par contre la chaleur paraît modifier cette spécificité. L'action de l'acide trichloracétique est plus complexe. Il sépare des protéides purement dits, des polyosides. Ces deux fractions, dans un cas, ont été antigéniques, et les anticorps formés réagirent spécifi-

quement avec leur fraction homologue. Il y a donc deux haptènes bien distincts, en présence des sérums expérimentaux.

Les protéides extraits du corps bacillaire sont toujours antigéniques. La chaleur n'altère pas la spécificité de ces fractions. Le fractionnement par l'acide phosphotungstique montre que l'activité fixatrice de l'alexine en présence d'un sérum antibacillaire (sérum d'un cheval ayant reçu des bacilles B. C. G. vivants) se concentre dans la fraction polyosidique. Nous avons obtenu le même résultat avec la fraction polyosidique isolée des protéides du milieu de culture par l'acide trichloracétique.

Des réactions croisées entre les protéides du milieu de culture et les protéides du corps bacillaire, d'une part, et les immunsérums correspondants d'autre part, ont montré qu'il n'y a pas de différence de spécificité. Il est ainsi vraisemblable qu'un même groupe d'antigènes existe dans nos deux préparations protéidiques. — Dans le cas particulier des sérums antibacillaires, l'activité fixatrice de l'alexine se concentre toujours dans la fraction polyosidique. Il est donc possible qu'un seul et unique haptène polyosidique réagisse avec les anticorps des sérums de tuberculeux.

Vu, le Doyen

ROUSSY.

Vu, le Président

Robert DEBRÉ.

*Vu et permis d'imprimer,
le Recteur de l'Académie de Paris*

CHARLÉTY.

Société d'Editions et d'Imprimeries

J. Peyronnet et Cie, Editeurs

7, Rue de Valois, Paris

